



Etudes des relations structure-activités de molécules photoactivables pour imager et déclencher des processus biologiques sous excitation 2-photon

Rahima Chennoufi

► To cite this version:

Rahima Chennoufi. Etudes des relations structure-activités de molécules photoactivables pour imager et déclencher des processus biologiques sous excitation 2-photon. Autre [q-bio.OT]. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT: 2015SACLN022 . tel-01270673

HAL Id: tel-01270673

<https://theses.hal.science/tel-01270673>

Submitted on 21 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY,
préparée à l'Ecole Normale Supérieure de Cachan**

ÉCOLE DOCTORALE N°577

Structure et Dynamique des Systèmes Vivants

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

Mme Rahima Chennoufi

Le 3 Décembre 2015

**Etudes des relations structure-activités de molécules photoactivables
pour imager et déclencher des processus biologiques sous excitation
2-photon**

Thèse présentée et soutenue à Cachan :

Composition du Jury :

Mme Andraud Chantal	Directeur de recherche, CNRS, ENS Lyon	Rapporteur
M Yves Mély	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
M Cedric Bouzigues	Maître de conférences, Ecole polytechnique	Examineur
Mme Florence Mahuteau-Betzer	Chargée de recherche, CNRS, Institut Curie	Examinatrice
Mme Joanne Xie	Professeur, ENS de Cachan	Président du jury
M Eric Deprez	Directeur de recherche, CNRS	Directeur de thèse

Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée (LBPA)
ENS CACHAN, CNRS-UMR 8113, IDA
61, avenue du président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX

À mes parents et mes grands-parents,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci donc au Dr Cedric Bouzigues, maître de conférence à l'école polytechnique, au Pr. Joanne Xie, professeur à l'ENS Cachan, ainsi qu'au Dr Florence Mahuteau-Betzer, chargée de recherche à l'institut Curie. Ma reconnaissance va également à Yves Mély, professeur à l'université de Strasbourg, et à Chantal Andraud, directrice de recherche CNRS à l'ENS Lyon, pour l'intérêt particulier porté à mes travaux de thèse et pour leurs remarques concernant ce manuscrit.

Je remercie nos collaborateurs de nous avoir fait confiance pour les expériences de biologie ; à l'équipe du Dr Marie-Paule Teulade-Fichou, le Dr Florence Mahuteau-Betzer et le Dr Blaise Dumat, responsables de la conception et de la synthèse des triphénylaminés et au Dr Anny Slama-Schwok, au Pr. Joanne Xie, au Dr Nicolas Bogliotti et au Dr Nhi-Ha Nguyen, responsables de la conception et de la synthèse des Nanotriggers de deuxième génération.

Je voudrais remercier le Dr Malcolm Buckle de m'avoir accueillie et intégrée au sein de son unité. Je le remercie pour sa personnalité et son organisation des « Xmas party ».

Evidemment, je dois remercier le Dr Eric Deprez pour la qualité de son encadrement tout le long de cette thèse et pour les nombreux échanges scientifiques et plus décontractés. Je vous remercie particulièrement de m'avoir accordé la confiance et l'autonomie nécessaires pour m'approprier ces deux projets scientifiques et les appréhender à ma façon ; mais aussi pour avoir su considérer mes remarques et mes propositions. En résumé, je vous remercie pour m'avoir permis d'évoluer en tant que jeune chercheur.

Je tiens également à remercier le Dr Etienne Henry pour m'avoir appris à dompter les instruments de spectroscopie et de microscopie de fluorescence. Je te remercie également pour ta gentillesse, ta patience et ta disponibilité dans n'importe quelles conditions.

Lorsque je pense à ces trois années de thèse au sein du LBPA, je ne peux m'empêcher de penser aux collègues qui ont rendu cette période agréable. A Françoise, Gladys et Huan, je vous remercie d'avoir toujours eu une oreille attentive et de bons conseils pour

l'expérimentation en laboratoire mais aussi pour tout le reste, tous les goûters, les déjeuners encore plus nombreux, les moments agréables partagés ensemble. En bref, je vous remercie d'avoir été présentes dans ma vie professionnelle et personnelle.

J'ai également une grande pensée pour mes autres collègues avec qui j'ai beaucoup échangé sur la vie de laboratoire et sur la vie tout court : Patrick, Stan, Samuel, Marine, Sarah, Akli, Thierry, Hervé, Martine, Maryline, Gaëlle, Marta, Aleksandra, Ouerdia, Anissa...

Merci à celles qui nous ont rejoints plus tard et qui ont contribué à rendre ma fin de thèse moins stressante, à Emeline et à Cyriane et ses nombreuses « boulettes ».

De manière plus personnelle, j'ai conscience d'avoir de la chance d'être bien entourée d'amies qui m'ont toujours soutenue et suivie durant mes études de manière générale et dans tous mes choix de vie. Je sais qu'on ne se le dit pas souvent, mais vous savez à quel point vous m'importez et m'apportez. Merci à Pauline, Hanan et Hind. J'espère que ma vie sera encore bien remplie de vous.

Je souhaite également remercier mon frère d'avoir été là malgré la distance ; et aussi à mes sœurs pour avoir été mes cobayes et de leur intérêt pour mon métier à mille lieux du leur. Merci d'être là coûte que coûte, d'avoir su gérer tous les moments de stress, de doute mais surtout d'avoir su partager tous les moments de bonheur, et d'avoir apporté de la joie dans ma vie par votre présence et celle de mes incroyables neveux.

J'aimerais remercier tout particulièrement mon mari qui a su comprendre, me soutenir et accepter mes contraintes durant cette thèse. Je sais que de rester à l'écart de ces travaux en tant que scientifique n'a pas dû être évident, mais tu as su me laisser évoluer, m'épanouir et réfléchir comme un jeune chercheur sans intervenir dans mes choix et mes idées. Je te remercie également pour tout ce que tu apportes à ma vie. A ces trois années de duo...

Pour finir, je voudrais remercier les personnes sans qui tout ça ne serait pas arrivé. A mes parents et mes grands-parents qui m'ont tout donné, leur amour, leurs valeurs, leur savoir, mais aussi leur force et leur détermination. A ces personnes qui auraient pu être à ma place si la vie en avait décidé autrement, mais qui se sont contentées de tout faire pour nous offrir toutes les opportunités de choisir et d'aimer notre métier. Aucun mot, ni aucune parole ne seraient suffisants pour exprimer ma gratitude et mon amour pour vous. La fierté visible dans vos yeux est ma plus belle récompense.

ABBREVIATIONS

ADNmt	ADN mitochondrial
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
ALA	acide-5-aminolévulinique
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor
Bzim	N-methyl benzimidazolium
CAD	Caspase-Activated Deoxyribonuclease
CaM	Calmoduline
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DD	death domain
DED	Death Effector Domain
DIABLO	Direct IAP Binding protein with a low pI
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
EGF	epidermal growth factor
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FADD	Fas Associated protein with DD
FMN	Flavine Mono Nucléotide
H ₂ DCFDA	2',7'-dichlorohydrofluorescein diacétate
Hp	Hematoporphyrine
HpD	dérivé d'hématoporphyrine
HtrA2	High temperature requirement protein A2
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
JNK	Jun N-terminal protein Kinase
LDL	low-density lipoprotein
MAL	methyl-aminolevulinic acid
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Pore
mTHPC	meso-tetra hydroxyphenylchlorin
NAD ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF-κB	Nuclear Factor κB

NIR	near infrared
NO	oxyde nitrique
NOS	NO Synthase
NP	Nanoparticule
NS	Nanoshutter
NT	Nanotrigger
Omi	Omi stress-regulated endoprotease
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDT	Photodynamic therapy
Pp IX	protoporphyrine IX
PS	Photosensibilisateur
PTP	Permeability Transition Pore
Py	pyridinium
Pyo	ortho-pyridine
RIP1	Receptor Interacting Protein 1
ROS	Reactive Oxygen Species
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TPAs	Triphénylaminés
TRADD	TNFR Associated protein with DD
TRAF2	TNF Receptor-Associated Factor 2
TRAILR	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor
UV	ultraviolet
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I INTRODUCTION	13
I – ETUDE DES TRIPHENYLAMINES POUR LE PHOTO-DECLenchement DE LA MORT CELLULAIRE	23
A- Photochimie.....	23
1- Type I	24
2- Type II	25
B- Localisation et type de mort cellulaire	26
1.- Apoptose	26
a) Voie extrinsèque	28
b) Voie intrinsèque	30
2.- Nécrose	33
C- Photosensibilisateurs	35
1.- PS de première génération	35
2.- PS idéal	36
3.- PS de deuxième génération	37
4.- PS de troisième génération	40
a) Ciblage passif	40
b) Ciblage actif	42
5.- PDT dans l'infrarouge	43
a) <i>Upconversion</i>	44
b) 2-photon	45
II – ETUDE DES NANOTRIGGERS POUR UNE PRODUCTION DE NO PHOTO-INDUITE	47
A- NO Synthase.....	48
1- Isoformes.....	48
2- Structure.....	48
B- Mécanisme de production de NO	50
1- Transfert d'électron dans le domaine réductase.....	50
2- Calmoduline	51
3- Synthèse de NO dans le domaine oxygénase	52
C- Localisation des NOS humaines et rôle du NO.....	53
1- Localisation tissulaire	53
2- Localisation subcellulaire.....	56
D- Régulation de la NOS.....	57
1- Régulations cellulaires	57
2- Inhibiteurs de la NOS.....	58
3 - Photocontrôle.....	61
III- OBJECTIFS	64
A- Etude des TPAs pour la thérapie photodynamique	64
B- Etude de NT de deuxième génération	67
CHAPITRE II PRINCIPES EXPERIMENTAUX	71
A- Microscopie de fluorescence.....	73
1- Microscopie d'épifluorescence.....	73
2- Microscopie confocale.....	75
3- Microscopie biphotonique	75
4- Co-localisation	77
B- Mesures spectrophysiques	78

C- Cytométrie en flux.....	79
1- Principe.....	79
2- Détection de ROS	81
3- Différenciation de la mort cellulaire.....	81
D- Mesures biochimiques.....	83
CHAPITRE III RESULTATS	85
I- COMPORTEMENT DIFFERENTIEL DE DERIVES CATIONIQUES TRIPHENYLAMINE DANS DES CELLULES FIXEES ET VIVANTES : DECLENCER ET IMAGER LA MORT CELLULAIRE	87
II- UTILISATION DES TRIPHENYLAMINES POUR IMAGER ET DECLENCER L' APOPTOSE SOUS EXCITATION 2-PHOTON	109
III- CARACTERISATION DE LA RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES TRIPHENYLAMINES ET DE LEUR CAPACITE A IMAGER ET DECLENCER LA MORT CELLULAIRE SOUS EXCITATION 1- ET 2-PHOTON	143
IV- CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DE NANOTRIGGERS DE DEUXIEME GENERATION POUR IMAGER ET PHOTO-DECLENCER LA PRODUCTION DE NO DEPENDANTE DE LA NOS.....	163
CHAPITRE IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	199

TABLE DES FIGURES

Figure I-1. Diagramme de Jablonski	17
Figure I-2. Excitation 2-photon	20
Figure I-3. solution de fluorescéine sous excitation 1- et 2-photon	20
Figure I-4. Mécanismes photophysiques et photochimiques de la PDT	24
Figure I-5. Changements morphologiques de la cellule en apoptose	27
Figure I-6. Complexes d'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque	28
Figure I-7. Activation et régulation de la voie intrinsèque	31
Figure I-8. Voie nécrotique	34
Figure I-9. Structure de la base des hématorporphyrines	35
Figure I-10. Structure de certains PS de deuxième génération approuvés cliniquement	38
Tableau 1. Principales propriétés photochimiques et photobiologiques de certains PS disponibles en clinique	38
Figure I-11. Représentation de la conversion ascendante de photon (<i>upconversion</i>)	44
Figure I-12. Structure quaternaire de la NOS	49
Figure I-13. Transfert d'électron à travers la iNOS homodimérique	50
Figure I-14. Production de NO à partir de deux réactions de mono-oxydation	52
Figure I-15. Structures du NADPH et de NS	61
Figure I-16. Structures de NS1 et NT1	62
Figure I-17. Structure générale des Triphénylaminés	64
Figure I-18. Structure des six triphénylaminés étudiées	66
Figure I-19. Structures générales de NT1 et des NT de deuxième génération	68
Figure I-20. Structure des NT de deuxième génération	69
Figure II-1. Microscopie d'épifluorescence et microscopie confocale	75
Figure II-2. Microscopie multiphotonique	77
Figure II-3. Principe de la cytométrie en flux	81
Figure II-4. Différenciation de la mort cellulaire par double marquage Annexine V/DAPI	83

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les phénomènes d'émission de lumière sont connus depuis l'Antiquité, où les premiers phénomènes de bioluminescence ont été observés dans la nature (vers luisants). A partir du XVIème siècle, des publications faisant part de phénomènes de luminescence à partir de plantes ou de minéraux apparaissent. En 1845, Sir John Frederick William Herschel fut le premier à observer la fluorescence, au niveau moléculaire, à partir d'une solution de quinine dans l'eau. Le terme de fluorescence a été introduit en 1853 par Stokes, suite à l'observation d'une émission de lumière de la fluorite sous excitation à une lumière de plus faible longueur d'onde. Depuis, de nombreuses molécules ou macromolécules (protéines) fluorescentes ont été extraites ou synthétisées.

Les molécules fluorescentes présentent un grand intérêt dans plusieurs domaines scientifiques, notamment en biologie. Dans ce domaine, ces molécules sont principalement utilisées pour visualiser la localisation et le cheminement de celles-ci ou de leur cible à travers les milieux et organismes cellulaires. Ces dernières décennies ont connus un important essor dans le développement des techniques de fluorescence pour une application biologique.

Récemment, des études se sont intéressées à la synthèse de molécules activables par excitation lumineuse. Ces molécules sont inertes à l'état fondamental et s'activent sous excitation lumineuse pouvant déclencher un signal ; elles sont appelées molécules photoactivables. Ces dernières peuvent être des petites molécules ou des macromolécules (protéines). Il existe différents groupes de molécules photoactivables selon le type de signal induit sous excitation lumineuse.

Les molécules photoconvertibles absorbent la lumière à une longueur d'onde spécifique, entraînant un changement de la conformation de la molécule et de ses caractéristiques spectrales. L'essor connu par la microscopie de super-résolution est principalement dû à ces molécules¹. Le problème majeur de la microscopie est sa limite de résolution liée à la diffraction de la lumière. Les molécules photoconvertibles permettent de surmonter la barrière de diffraction et de détecter et différencier des molécules uniques dans une population dense de molécules, à l'aide de la microscopie de super-résolution. Cette stratégie repose sur l'activation stochastique de molécules fluorescentes photoconvertibles, afin d'exciter les molécules d'une population par intermittence, de les imager et de les photoblanchir. Ainsi, les molécules se trouvant dans le même « volume » de diffraction sont temporairement séparées. En assemblant les différentes images de molécule unique obtenues, on peut reconstituer l'image d'ensemble par la super-résolution. Cette stratégie constitue la base de trois techniques développées récemment : la microscopie par localisation photoactivée (PALM, PhotoActivated Localization Microscopy), la microscopie de fluorescence par localisation

photoactivée (FPALM, Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy) et la microscopie optique de reconstruction stochastique (STORM, STochastic Optical Reconstruction Microscopy).

Certaines molécules photoactivables engendrent un signal indirect suite à leur activation. Parmi celles-ci, on trouve les molécules dites « cagées ». Celles-ci sont des molécules photosensibles greffées à une substance biologiquement active et possédant un groupement « protecteur » photolabile rendant la substance inactive. Sous excitation lumineuse, le groupe protecteur se détache de la substance biologique de manière irréversible, la rendant ainsi active. Il en est de même pour l'internalisation photochimique (PCI, photochemical internalization) dont le principe consiste en l'utilisation de molécules photosensibles se localisant dans la membrane plasmique et la membrane des vésicules de transport intracellulaire, servant à l'internalisation de molécules cibles. Sous excitation lumineuse, les molécules photosensibles détériorent la membrane des vésicules permettant la libération des molécules cibles dans le cytosol. Ces deux techniques permettent un contrôle spatio-temporel de la libération et l'activation de molécules cibles.

Le dernier groupe de molécules photoactivables inclut les molécules dont l'activation par excitation lumineuse induit, de manière directe, un signal. Ces molécules, lorsqu'elles sont excitées, interagissent directement avec des constituants cellulaires pour déclencher un processus biologique. Les deux familles de molécules étudiées pendant ma thèse sont des molécules fluorescentes appartenant à ce groupe. Les premières molécules présentées dans ce manuscrit sont des triphénylamines (TPAs) pouvant photo-induire la mort cellulaire suivant le principe de la thérapie photodynamique (PDT, photodynamic therapy). La seconde famille de molécules, les « nanotriggers » (NTs), a été conçue pour photo-réguler la production d'oxygène nitrique (NO) en se fixant à l'enzyme responsable de cette production, la NO Synthase (NOS). L'autre propriété commune à ces deux familles de molécules est liée à leur capacité à absorber simultanément deux photons.

Avant de rentrer plus en détails dans l'étude de ces deux familles de molécules, il est important d'expliquer les principes de la fluorescence et de l'absorption multiphoton.

Fluorescence

La fluorescence est un des processus de la photoluminescence, durant lequel une molécule absorbe un photon puis émet un photon à partir d'un état d'excitation électronique. L'étude de la fluorescence connaît un grand essor en biologie cellulaire. En effet, son utilisation a permis de développer de nombreuses techniques de visualisation et de détection de phénomènes biologiques, comme la cytométrie en flux, les analyses génétiques, les imageries cellulaires ou intravitales.

Théorie

Le phénomène de fluorescence peut être schématisé par le diagramme de Jablonski (Figure I-1).

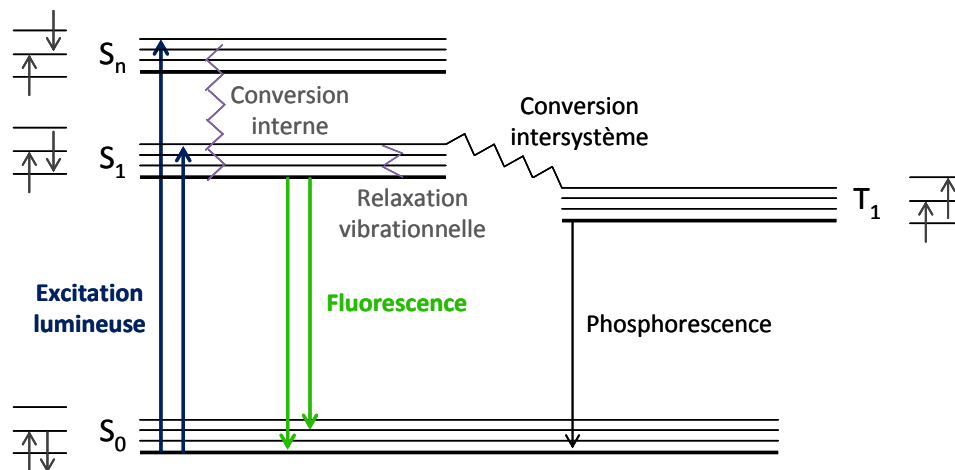


Figure I-1. Diagramme de Jablonski.

Lorsqu'une molécule à l'état fondamental S_0 interagit avec la lumière, elle absorbe l'énergie d'un photon et passe dans un état excité $S_1 \dots S_n$, où un électron dans l'état excité est couplé à un second électron dans l'état orbital plus bas (spins opposés). Il existe plusieurs niveaux d'énergie à l'état excité singulet, dont le plus stable est celui de niveau d'énergie le plus bas (S_1). Lorsque la molécule est excitée à un niveau d'énergie plus élevé ($S_{n \geq 2}$), elle se désexcite rapidement jusqu'au niveau d'énergie S_1 par conversion interne. L'énergie correspondante est alors dissipée sous forme de chaleur. De même, lorsque la molécule est excitée dans un niveau vibrationnel supérieur de l'état S_1 , elle se désexcite également par conversion interne jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas de S_1 . L'absorption d'un photon et

la conversion interne étant des phénomènes très rapides (10^{-15} et 10^{-12} s, respectivement), une molécule excitée se retrouve presque instantanément au niveau d'énergie vibrationnel le plus bas de l'état S_1 .

La molécule peut ensuite se désexciter de plusieurs manières. Elle peut se désexciter de manière non radiative, ou émettre un photon (fluorescence). La fluorescence se fait très rapidement (typiquement 1 à 10 ns). Néanmoins, la fluorescence reste un phénomène lent contrairement à l'absorption et la conversion interne. La molécule peut également passer, par conversion intersystème, à un état triplet T_1 , où l'électron de l'orbital excité présente un spin de même orientation que celui de l'électron de l'orbital dans son niveau fondamental. A partir de l'état triplet, la molécule peut provoquer une fluorescence retardée, c'est-à-dire qu'elle passe de l'état T_1 à l'état S_1 puis fluoresce. Elle peut aussi se désexciter par phosphorescence et revenir à l'état fondamental S_0 . Cette transition est dite interdite mais peut néanmoins survenir par couplage spin-orbite. Par conséquent, la phosphorescence est un phénomène de cinétique lente (ms jusqu'à s).

Caractéristiques

Le **coefficient d'extinction molaire** ϵ ($\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) est une caractéristique intrinsèque d'un composé, représentant la force d'absorption linéaire, c'est-à-dire la probabilité qu'a le composé d'absorber à une longueur d'onde donnée. Il obéit à la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon lc$$

où A est l'absorbance, c est la concentration de l'échantillon et l la longueur du trajet optique.

Le **temps de vie de fluorescence** τ (s) est le temps moyen de résidence d'un fluorophore à l'état excité avant le retour à l'état fondamental. Il peut être mesuré par l'analyse du déclin de fluorescence, suivant la loi exponentielle :

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

où I_0 est l'intensité de fluorescence initiale.

τ est caractérisé par la dépopulation du niveau excité par les processus radiatifs et non radiatifs et est reliée aux constantes cinétiques de désexcitation correspondantes, par la relation :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

où k_r est la constante cinétique de désexcitation radiative et k_{nr} est la constante cinétique de désexcitation non radiative.

Le **rendement quantique de fluorescence** ϕ_f est le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. Il représente donc la fraction des phénomènes radiatifs dans la désexcitation de la molécule :

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Lorsque la désexcitation non radiative est négligeable, le ϕ_f est proche de 1.

Le **déplacement de Stokes** représente la différence entre les maxima des longueurs d'onde d'absorption et d'émission.

L'intensité de fluorescence ou la **brillance** d'un fluorophore est déterminée par le produit du coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique.

Solvant : le solvant, dû à sa polarité, peut modifier les niveaux d'énergie de la molécule influençant ainsi les propriétés d'émission. En effet, le fluorophore possède un moment dipolaire à l'état excité plus important qu'à l'état fondamental. Après excitation, les dipôles du solvant entourant le fluorophore peuvent se réorienter ou se relaxer, ce qui diminue l'énergie de l'état excité du fluorophore. Ainsi, l'émission du fluorophore est déplacée vers le rouge (déplacement bathochrome). Donc plus le solvant est polaire, plus le déplacement bathochrome augmente.

Excitation 2-photon

Principe

L'absorption à deux photons (absorption non linéaire) est le passage d'une molécule de l'état fondamental S_0 à un état excité S_n par l'absorption simultanée de deux photons de même énergie (Figure I-2). L'état excité final du fluorophore est le même que celui atteint par une excitation en 1-photon. L'émission de fluorescence et toutes les propriétés de fluorescence (émission et temps de vie de fluorescence) qui découlent de l'excitation 2-photon sont donc

identiques à celles observées sous excitation 1-photon. En revanche, la longueur d'onde d'absorption à 2-photon est théoriquement deux fois la longueur d'onde d'absorption 1-photon. Par conséquent, une excitation 2-photon requiert une longueur d'onde dans la région proche de l'infrarouge (NIR, near-infrared) ou l'infrarouge.

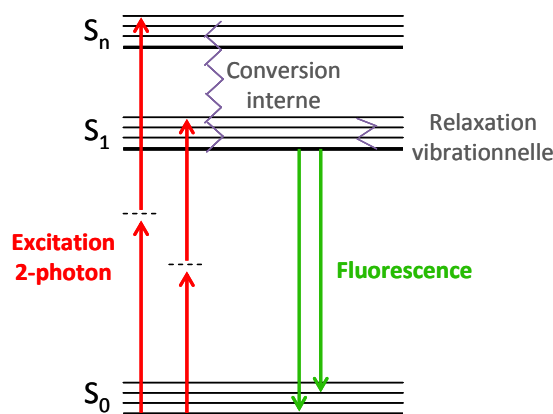


Figure I-2. Excitation 2-photon.

La probabilité que deux photons interagissent simultanément avec un fluorophore est faible ; c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser une source lumineuse ayant une forte densité de photons. Donc en pratique, l'excitation biphotonique se caractérise par une dépendance quadratique en intensité et s'effectue à l'aide d'un laser pulsé fournissant une intensité locale élevée tout en permettant de conserver une puissance moyenne acceptable pour l'échantillon. L'absorption non linéaire présente un intérêt majeur pour de nombreuses applications grâce au confinement spatial intrinsèque de la zone d'excitation réduite à un point focal (Figure I-3).

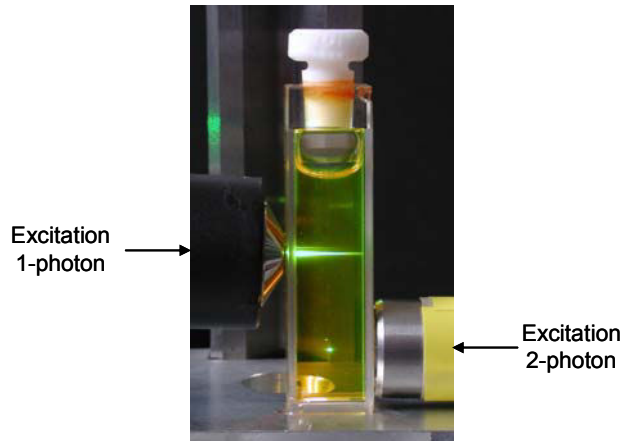


Figure I-3. Solution de fluorescéine sous excitation 1- et 2-photon. Sous excitation 1-photon, on observe une émission de la fluorescéine tout le long du trajet optique ; alors que sous excitation 2-photon l'émission de la fluorescéine est confinée à un point focal.

Caractéristiques

La section efficace d'absorption σ caractérise la probabilité d'absorption d'un photon par un fluorophore. Elle représente la surface qui quantifie cette probabilité et son unité est donc cm^2 . Pour l'absorption 1-photon, le nombre de photons absorbés par seconde (NA_1) est donné par la formule :

$$NA_1 (\text{photon/s}) = \sigma_1 (\text{cm}^2) \times I (\text{photon} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$$

où I est le flux de photons et σ_1 la section efficace d'absorption 1-photon.

L'absorption 2-photon implique l'absorption de 2 photons simultanément, c'est pourquoi le nombre de photons absorbés par seconde en 2-photon (NA_2) est :

$$NA_2 (\text{photon/s}) = \sigma_2 \times I^2$$

Donc pour équilibrer les unités, l'unité de σ_2 doit être $\text{cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$.

L'absorption non linéaire à deux photons a été décrite de manière théorique par Maria Göppert-Mayer en 1931. Son nom est donné à l'unité de la section efficace d'absorption à deux photons qui s'exprime donc en Göppert-Mayer (GM) : $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$

La **brillance 2-photon** d'un fluorophore est déterminée par le produit de la section efficace d'absorption 2-photon et le rendement quantique du fluorophore.

I – Etude des triphénylamines pour le photo-déclenchement de la mort cellulaire

La thérapie photodynamique est une méthode de traitement basée sur l'administration d'une molécule photosensibilisante et de lumière. Dans l'idéal, ces deux composants n'ont aucun effet toxique lorsqu'ils sont utilisés indépendamment l'un de l'autre, mais la combinaison des deux induit des dégâts cellulaires et tissulaires de manière dépendante à l'oxygène. Ces phénomènes biologiques ne sont induits que sous l'excitation de la molécule photosensibilisante à une lumière de longueur d'onde appropriée pour l'activation de celle-ci. Ce premier chapitre a pour objectif d'expliquer, de manière générale, le mode d'action des molécules de la PDT et les dommages causés par leur activation.

A- Photochimie

Au départ, le photosensibilisateur (PS) se trouve dans son état singulet fondamental (PS_0) suite à l'absorption de la lumière (photon, $h\nu$), le PS est porté à différents états singulets ($^1PS_1^*$, $^1PS_2^*$... $^1PS_n^*$) correspondant à un état électronique excité d'énergie supérieure (Figure I-4). Le PS peut alors subir deux phénomènes afin de retourner à l'état singulet excité de plus bas niveau d'énergie ($^1PS_1^*$) : la conversion interne et la relaxation vibrationnelle. L'état singulet excité est de courte durée (quelques nanosecondes). A cette étape, le retour à l'état singulet fondamental (PS_0) peut se faire de trois manières :

- Par émission d'un photon par fluorescence
- Par désexcitation non radiative
- Par transfert de l'énergie à un état triplet 3PS_1 par conversion intersystème. Le PS peut relaxer de l'état triplet excité $^3PS_1^*$ à l'état fondamental PS_0 par émission de phosphorescence.

Cependant, l'état triplet excité a une durée de vie plus longue (quelques ms), permettant à la molécule d'interagir avec d'autres molécules dans son environnement proche, générant ainsi des espèces photo-actives. Le $^3PS_1^*$ peut alors intervenir dans deux voies de photo-oxydation : réaction photochimique de type I et réaction photochimique de type II.

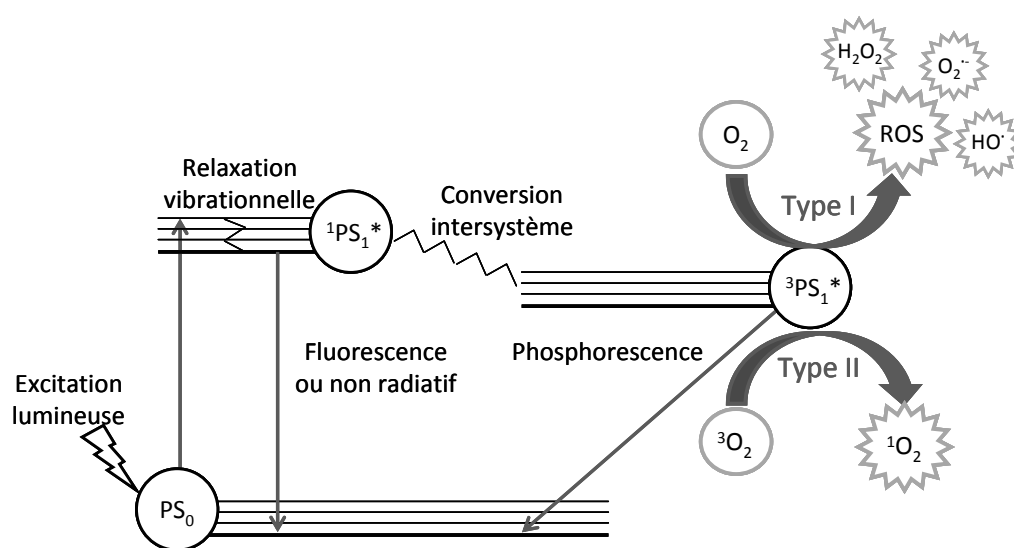


Figure I-4. Mécanismes photophysiques et photochimiques de la PDT.

1- Type I

La réaction photochimique de type I implique un transfert d'électron du PS à l'état triplet excité $^3\text{PS}_1^*$ vers des substrats biologiques (NADPH, Acides nucléiques, protéines) pour former des radicaux et des ions radicalaires (PS^\cdot et biomolécule $^{\cdot+}$), pouvant conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species). Ces radicaux libres ainsi formés, tout comme le $^3\text{PS}_1^*$, peuvent réagir rapidement avec d'autres molécules biologiques entraînant une cascade de réaction oxydatives, ou avec l'oxygène moléculaire pour former l'ion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$)². Ce dernier n'est pas très réactif dans un système biologique, mais il peut réagir avec lui-même produisant ainsi du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) catalysé par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD). Le peroxyde d'hydrogène est une molécule qui diffuse très facilement à travers les membranes biologiques, pouvant passer d'un compartiment cellulaire à un autre, ce qui le rend très efficace pour la propagation des dommages oxydatifs. Le peroxyde d'hydrogène intervient dans la formation du radical hydroxyle (HO^\cdot) par deux types de réaction^{2,3} :

- Réaction de Haber-Weiss : le peroxyde d'hydrogène réagit avec l'ion superoxyde.

$$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{HO}^- + \text{HO}^\cdot$$
- Réaction de Fenton : catalysée par un ion métallique.

$$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO}^- + \text{HO}^\cdot$$

Le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) est une espèce pouvant attaquer et oxyder n'importe quelle molécule. Il est aussi très réactif, c'est pourquoi il a tendance à cibler les molécules situées près de son site de formation.

2- Type II

La réaction photochimique de type II implique un transfert d'énergie du PS à l'état triplet excité $^3\text{PS}_1^*$ vers l'oxygène moléculaire, qui se trouve à l'état triplet à son état fondamental ($^3\text{O}_2$). L'oxygène singulet ainsi formé se retrouve à l'état singulet excité ($^1\text{O}_2^*$), tandis que le PS retourne à son état fondamental (PS_0). Pour que cette réaction soit possible, il faut que la différence d'énergie entre $^3\text{PS}_1^*$ et $^1\text{PS}_0$ soit supérieure à la différence d'énergie entre $^1\text{O}_2^*$ et $^3\text{O}_2$ ($94.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)⁴.

L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2^*$) a un temps de vie très court, ce qui limite son champ de réaction à son environnement très proche (entre 10 à 30 nm). Il peut réagir de manière directe avec de nombreux composants cellulaires. Les acides aminés des protéines cellulaires sont une cible importante de l'oxygène singulet. Celui-ci réagit principalement avec les résidus cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine et méthionine, due à la forte réactivité de leur chaîne latérale⁵. L'oxygène singulet peut aussi interagir avec les lipides insaturés (phospholipides et cholestérol constituant les membranes biologiques) pour donner des hydroperoxydes de lipides⁶. L'oxygène singulet peut aussi provoquer des oxydations de l'ADN, avec une préférence pour la guanine, dû à son faible potentiel d'ionisation⁷. Il peut tout aussi bien réagir avec les bases nucléiques qu'avec le désoxyribose, créant ainsi des dommages difficilement réparables par la cellule. L'oxygène singulet peut aussi réagir avec le PS à l'état fondamental, provoquant une dégradation du PS visible en imagerie par une extinction de la fluorescence (photoblanchiment).

Pour la plupart des PS utilisés en PDT, la réaction dominante est la réaction photochimique de type II.

Une accumulation des dommages oxydatifs causés par l'oxygène singulet ou par les ROS aboutit à des mutations ou à la mort cellulaire. Parmi les types de mort cellulaire connus, l'apoptose et la nécrose semblent pouvoir être déclenchées par une production d'espèces radicalaires de l'oxygène.

B- Localisation et type de mort cellulaire

L'internalisation des PS dans les cellules cancéreuses est cruciale pour une PDT efficace. La localisation intracellulaire des PS connus a été déterminée dans des cellules en culture, permettant de comprendre la relation entre leur structure et leur localisation. Les points importants pour la détermination de leur localisation sont la charge ionique nette allant de -4 (anionique) à +4 (cationique), le degré d'hydrophobicité (coefficient de partition octanol/eau) et le degré d'asymétrie dans la molécule. Les PS hydrophobes cationiques ou possédant jusqu'à 2 charges négatives peuvent diffuser à travers la membrane plasmique et se relocaliser dans d'autres membranes intracellulaires. Les PS moins hydrophobes ayant plus de 2 charges négatives ont tendance à être trop polaire, ce qui empêche leur diffusion à travers la membrane plasmique ; ils sont donc internalisés dans les cellules par endocytose. Alors que les PS cationiques moins hydrophobes peuvent pénétrer dans les cellules par endocytose⁸ ou grâce aux transporteurs de cations organiques^{9,10}. L'excitation lumineuse des PS induit une production de ROS de durée de vie courte, ce qui limite la zone d'action à l'environnement proche. La localisation subcellulaire d'un PS est donc déterminante pour connaître le type de mort cellulaire induit et comprendre son mécanisme. Nous nous intéresserons à deux types de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose.

1.- Apoptose

L'apoptose est une forme physiologique de mort cellulaire, hautement régulée et nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Une cellule apoptotique présente de nombreux changements morphologiques (Figure I-5). Le phénomène le plus caractéristique de l'apoptose survient à un stade précoce, il s'agit de la rétraction du noyau (pycnose). Ce phénomène est dû à une condensation de la chromatine. Au même stade, la cellule présente une forte diminution de taille avec une condensation du cytoplasme et un rétrécissement des organites cellulaires. Ces phénomènes sont suivis d'un bourgeonnement de la membrane plasmique (blebbing) caractérisé par de vastes évaginations prolongeant la membrane plasmique et du processus de caryorexie, caractérisé par une fragmentation du noyau. Les cellules apoptotiques finissent par se diviser en corps apoptotiques qui sont des vésicules constituées de la membrane plasmique à partir des bourgeons membranaires et contenant les organites intacts condensés avec ou sans fragments nucléaires. Au moment du

bourgeonnement membranaire, la membrane plasmique présente un changement de répartition des phosphatidylsérines qui passent du feuillet interne de la membrane plasmique au feuillet externe. L'externalisation de ces phospholipides contribue à la reconnaissance et la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires. L'apoptose n'induit donc pas de réaction inflammatoire puisqu'il n'y a pas de relargage des composants intracellulaires dans le milieu extracellulaire et que les corps apoptotiques sont rapidement digérés¹¹.

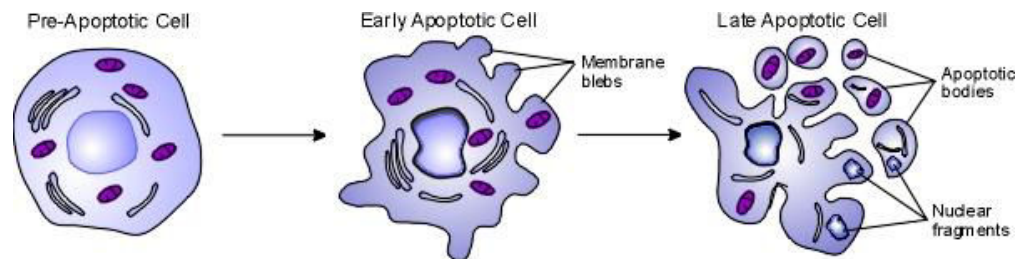


Figure I-5. Changements morphologiques de la cellule en apoptose. Lors de l'apoptose précoce, la cellule se contracte et forme des bourgeonnements membranaires (*membrane blebs*). Les cellules en apoptose tardive subissent une fragmentation nucléaire et se divisent en corps apoptotiques (*apoptotic bodies*).

D'un point de vue moléculaire, l'activation d'une famille de protéines, les caspases (Cysteiny-ASPartate-cleaving proteASES), est cruciale¹². Ces protéases peuvent intervenir dans différents processus biologiques comme la maturation de certaines cytokines ou le développement embryonnaire, mais elles jouent surtout un rôle central dans l'apoptose. Dans le cytoplasme, les caspases sont sous forme inactive, appelées procaspases. Il existe deux types de caspases différenciés selon leur position dans la cascade d'activation des caspases : les caspases initiatrices (-2/-8/-9/-10) et les caspases effectrices (-3/-6/-7). Les procaspases initiatrices interagissent avec des protéines cytoplasmiques, créant ainsi des complexes d'activation de l'apoptose, au sein desquels elles sont activées par auto-clivage et dimérisation. Les caspases initiatrices activées clivent à leurs tours les procaspases effectrices pour les activer. Par la suite, les caspases effectrices inactivent par clivage des substrats protéiques essentiels à la survie cellulaire. L'activation en cascade des caspases permet une amplification du signal. Deux grandes voies principales conduisent à l'activation des caspases : la voie des récepteurs de mort (extrinsèque) et la voie mitochondriale (intrinsèque).

a) Voie extrinsèque

La **voie extrinsèque** implique des récepteurs de mort dont les plus connus sont les récepteurs Fas (ou CD95 ou APO-1), TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1), TRAILR1 et TRAILR2 (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1 and 2). Les ligands de ces récepteurs sont des cytokines membres de la superfamille des $TNF\alpha$, incluant TNF, Fas Ligand (FasL) et TRAIL. Les récepteurs de mort sont composés d'un domaine extracellulaire, d'un domaine intracellulaire et d'un domaine transmembranaire. Le domaine extracellulaire (N-terminal) est constitué de plusieurs régions riches en cystéine et du domaine de liaison au ligand. Le domaine intracellulaire (C-terminal) est composé d'un domaine de mort DD (death domain)¹³ pouvant s'associer aux domaines DD d'autres molécules de signalisation, déclenchant ainsi la transduction du signal apoptotique. La liaison du ligand au récepteur de mort induit une trimérisation du récepteur, renforcée par la formation de ponts disulfure au niveau des régions riches en cystéine du domaine extracellulaire¹⁴. La formation des ponts disulfure permet une stabilisation du trimère. La trimérisation entraîne un changement conformationnel du domaine DD permettant le recrutement de molécules adaptatrices et de la procaspase-8 ou -10, formant un complexe d'initiation de la signalisation apoptotique. Selon le type de ligand et de récepteur impliqué dans la trimérisation du récepteur, différentes voies de signalisation peuvent être activées, impliquant la formation de différents complexes d'activation.

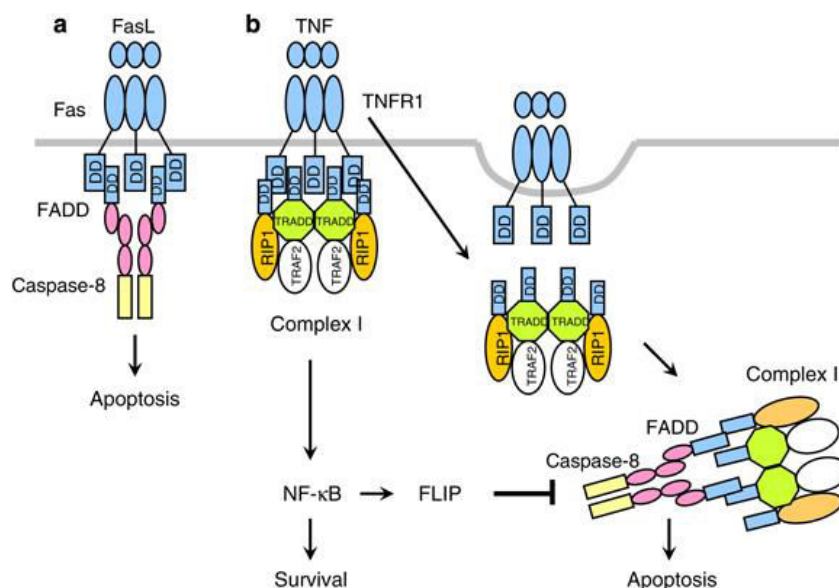


Figure I-6. Complexes d'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque¹⁵. a) formation du complexe DISC par les récepteurs Fas et TRAIL. b) formation des complexes I et II suite à l'activation des récepteurs TNFR1.

Lorsque la voie extrinsèque implique la liaison des récepteurs Fas, TRAILR1 ou TRAILR2, il y a la formation d'un complexe protéique appelé DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Figure I-6)¹⁵. La liaison des ligands FasL ou TRAIL à leur récepteur conduit au recrutement de la protéine FADD (Fas Associated protein with DD), qui se fixe à la partie intracellulaire du récepteur par interaction de leurs domaines DD respectifs¹⁶. La procaspase-8/-10 se fixe à la protéine FADD par interaction des domaines DED (Death Effector Domain) présents sur les procaspases-8/-10 et sur FADD. Le récepteur trimérique lié à son ligand, ainsi que les protéines FADD et procaspases-8/-10 constituent le complexe DISC. L'accumulation de procaspase-8/-10 à proximité les unes des autres dans le complexe DISC induit une dimérisation et une activation mutuelle de celles-ci par auto-protéolyse. L'activation des caspases initiatrices est régulée par la protéine c-FLIP (cellular FLICE Inhibitory Protein), qui peut interagir avec les domaines DD de FADD. Cette interaction empêche la fixation des procaspases-8/-10 par compétition et donc la proximité des procaspases nécessaire à leur activation. La quantité de caspase-8 activée détermine le type de mécanisme d'activation des caspases effectrices. Une quantité importante de caspase-8 active directement les procaspases-3/-7 (type 1), tandis qu'une faible quantité de caspase-8 médie l'activation de la procaspase-3/-7 par une amplification de l'activation impliquant la mitochondrie (type 2). L'activation des procaspases-8/-10 via Fas/FasL nécessite une internalisation du récepteur et un relargage du complexe DISC dans le cytosol¹⁷, et peut se faire par les deux types de mécanismes. En revanche, le signal transduit par l'activation des récepteurs TRAIL ne dépend pas de l'internalisation du récepteur et ne suit que le mécanisme de type 2¹⁸.

Par ailleurs, lorsque l'activation de la voie extrinsèque implique la fixation de TNF α au récepteur TNFR1, c'est la protéine TRADD (TNFR Associated protein with DD) qui est recrutée. Comme FADD, TRADD se fixe à la partie intracellulaire du récepteur par interaction de leurs domaines DD. Cette interaction peut entraîner la formation de deux complexes activant des voies de survie cellulaire ou d'apoptose (Figure I-6)¹⁹ :

- Complexe I : TRADD sert de recruteur et de pilier à la formation du complexe I, par interaction avec les protéines TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) et RIP1 (Receptor Interacting Protein 1). La formation du complexe I induit l'activation des protéines JNK (Jun N-terminal protein Kinase) et NF- κ B (Nuclear Factor κ B). L'activation de NF- κ B permet la synthèse de protéines anti-apoptotiques telles que FLIP_L, Bcl-xL, A1/Bfl-1, XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis) et c-IAP (cellular Inhibitor of Apoptosis) 1 et 2. Alors que l'activation de la protéine JNK est associée à

une production de ROS activant la protéine ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) et la dégradation de FLIP_L par le protéasome. Le récepteur TNFR1 activé, lié au complexe I, est ensuite endocyté et le complexe TRADD/TRAF2/RIP1 est dissocié du récepteur²⁰.

- Complexe II : le complexe TRADD/TRAF2/RIP1 relargué dans le cytosol recrute les protéines FADD et procaspase-8/-10, constituant ainsi le complexe II. Les procaspases-8/-10 sont activées par clivage et dimérisation au sein de ce complexe II. Les caspases-8/-10 actives sont larguées dans le cytosol et activent à leur tour les procaspases effectrices (-3/-7).

b) Voie intrinsèque

La **voie intrinsèque** implique de nombreux événements initiés par la mitochondrie (Figure I-7). Cette voie peut être activée par différents signaux comme les radiations, les toxines, l'hypoxie ou les radicaux libres. Tous ces signaux conduisent à une perte de potentiel de la membrane mitochondriale ($\Delta\psi_m$), une ouverture des pores de perméabilité membranaire (PTP = Permeability Transition Pore ou MOMP = Mitochondrial Outer Membrane Pore) et un relargage de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol. Il y a deux groupes de protéines pro-apoptotiques larguées dans le cytosol. Dans le premier groupe, on trouve le cytochrome c, Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP Binding protein with a low pI) et Omi/HtrA2 (Omi stress-regulated endoprotease/High temperature requirement protein A2). Le cytochrome c libéré dans le cytosol se fixe à la protéine Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor) et l'active. La protéine Apaf-1 recrute, de manière ATP-dépendante, la procaspase-9 par interaction de leurs domaines CARD respectifs. Le complexe ainsi formé, appelé apoptosome, permet l'activation de la caspase-9, qui est ensuite larguée et active les caspases effectrices. Les protéines Smac/DIABLO et Omi/HtrA2, une fois libérées dans le cytosol, antagonisent l'activité des protéines inhibitrices de l'apoptose IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins), favorisant ainsi l'activation des caspases²¹. Le deuxième groupe de protéines pro-apoptotiques, constitué de AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et de l'endonucléase G (EndoG), est libéré dans le cytosol à un stade plus tardif de l'apoptose. Ces protéines se transloquent dans le noyau où elles condensent la chromatine périphérique et clivent l'ADN en fragments de grande taille (50 à 30 kb)²². Ces protéines fonctionnent de manière indépendante aux caspases.

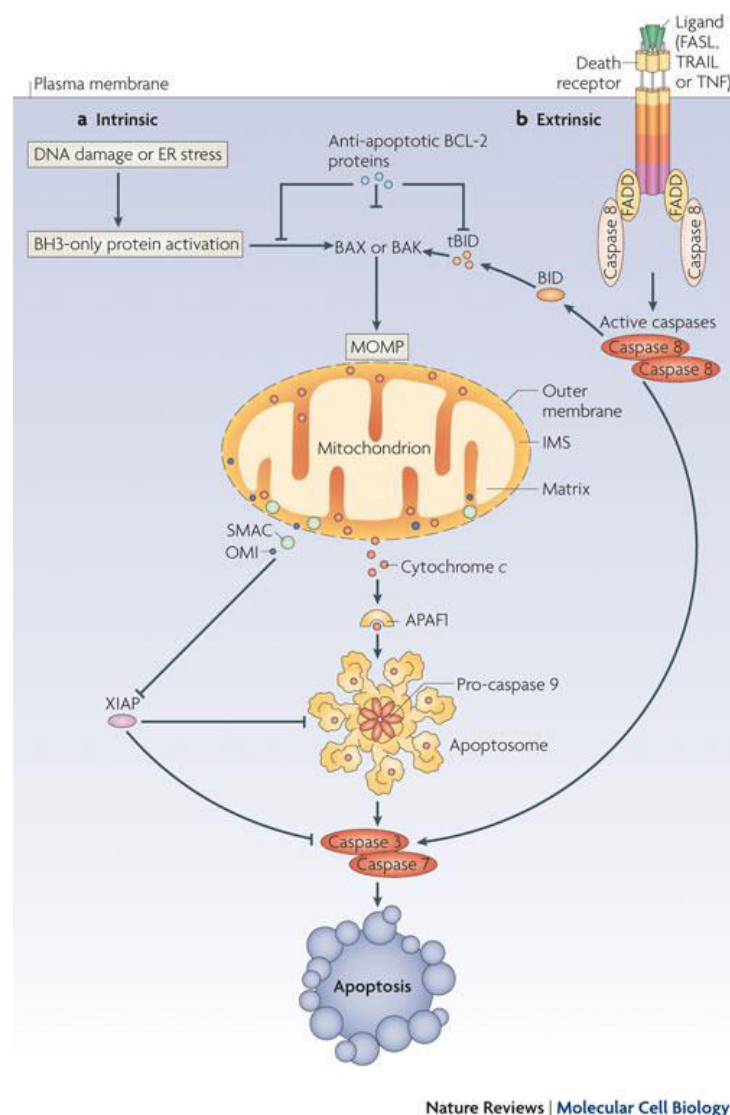


Figure I-7. Activation et régulation de la voie intrinsèque²³. Les signaux de la voie intrinsèque activent les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont Bax qui induit la formation des pores mitochondriaux (MOMP). Le relargage de protéines mitochondriales dans le cytoplasme conduit à la formation d'un complexe, apoptosome, activant les caspases effectrices.

Le contrôle et la régulation des événements apoptotiques dans la voie mitochondriale se fait par des protéines membres de la famille Bcl-2. Ces protéines jouent un rôle majeur dans la perméabilité de la membrane mitochondriale et dans la détermination de l'arrêt ou de la poursuite du processus apoptotique. Parmi ces protéines, certaines sont pro-apoptotiques comme Bax, Bad, Bak, Bim, Bik ou Bid ; d'autres sont anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S ou Bcl-w. Les protéines Bcl-2, Bcl-X_L et Bak sont des protéines membranaires majoritairement localisées dans la membrane externe mitochondriale ; alors que la plupart des autres protéines de la famille Bcl-2 sont cytosoliques et se transloquent dans la mitochondrie

sous l'effet d'un signal apoptotique. Par exemple, la protéine Bid est cytosolique dans une cellule saine et peut être clivée en tBid par la caspase-8 lors de l'apoptose. La forme tronquée tBid se relocalise dans la mitochondrie où elle induit l'oligomérisation de Bax et Bak qui forment des pores à travers la membrane mitochondriale²⁴.

Les voies intrinsèque et extrinsèque aboutissent à l'activation des caspases effectrices (-3/-6/-7). Ces caspases clivent de nombreuses protéines régulatrices de la survie cellulaire, les rendant responsables des changements morphologiques et phénotypiques de la cellule en apoptose. Elles clivent par exemple des protéines régulatrices du cytosquelette comme l'actine, la gelsoline ou des fodrines, provoquant une désorganisation de celui-ci. Ces clivages contribuent au phénomène de bourgeonnement membranaire (blebbing)²⁵. De même, elles clivent des lamines structurant le noyau, ce qui contribue à la condensation de la chromatine. De plus, les caspases effectrices perturbent l'intégrité du génome en activant des endonucléases cytoplasmiques et en inhibant des protéines nécessaires à la répartition du génome, provoquant une fragmentation de l'ADN. La principale endonucléase clivée et activée par ces caspases est la protéine ICAD (Inhibitor of CAD/DFF45), permettant la libération de CAD (Caspase-Activated Deoxyribonuclease), une nucléase responsable de la fragmentation de l'ADN²⁶. Parmi les protéines réparant les cassures de l'ADN, on trouve la PARP (Poly (ADP-Ribose) Polymerase) et la DNA-PKcs qui sont clivées et inactivées par les caspases effectrices.

En plus de son rôle dans le clivage de protéines régulatrices de la survie cellulaire, la caspase-3 participe à un processus d'amplification de la cascade d'activation des caspases en clivant et activant la caspase initiateur -9²⁷.

En PDT, les PS se localisant dans la mitochondrie sont connus pour photo-induire un processus d'apoptose. Les ROS produits lors de la PDT peuvent intervenir dans ce processus de mort cellulaire à plusieurs niveaux. Il est déjà connu que les ROS déclenchent la voie apoptotique intrinsèque en interagissant avec les protéines constituant les PTP²⁸. L'oxydation de ces protéines a un impact significatif sur les flux d'ions dans la mitochondrie. En effet, la simple exposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) au niveau de la membrane mitochondriale provoque l'effondrement du potentiel membranaire de la mitochondrie ($\Delta\psi_m$)²⁹, une translocation mitochondriale et l'oligomérisation de Bax et Bak et une libération du cytochrome c. La diminution de cytochrome c mitochondrial mène à l'augmentation de ROS due à la perturbation de la chaîne de transport d'électrons (chaîne respiratoire)³⁰. De plus, les

ROS produits lors de la PDT peuvent directement interagir avec la chaîne respiratoire qui, par son fort potentiel redox, est une cible idéale pour les ROS. L'ADN mitochondrial (ADNmt) peut aussi être la cible de ROS, due à sa proximité avec la chaîne respiratoire. Comme l'ADNmt code pour 13 polypeptides constituant la chaîne respiratoire, des dommages sur celui-ci et sur l'expression de ses ARNm compromettent donc la fonction respiratoire. Ce phénomène favorise la production de ROS suscitant ainsi une cascade amplificatrice de production de ROS et de dommages sur l'ADNmt déclenchant l'apoptose.

2.- Nécrose

D'un point de vue morphologique, la nécrose est caractérisée par une augmentation du volume de la cellule (oncoses), un gonflement des organites cellulaires, une rupture de la membrane plasmique et donc un déversement des composants cellulaires, dont des molécules pro-inflammatoires, dans l'environnement extracellulaire. Les cellules nécrotiques présentent souvent des changements morphologiques du noyau caractérisés par une coupure de l'ADN donnant des fragments de taille variable, contrairement à l'apoptose. La cellule nécrotique peut aussi présenter une vacuolisation du cytoplasme.

D'un point de vue moléculaire, la mort cellulaire par nécrose peut être induite par différentes voies. Toutes ces voies possèdent une protéine commune jouant un rôle crucial dans l'apoptose : RIP1 (Receptor Interacting Protein 1). Cette protéine est connue pour son interaction dans le complexe I de la voie apoptotique extrinsèque médiée par TNFR (Figure I-8). La formation de ce complexe induit l'activation de NF- κ B³¹. Lors de l'apoptose, la formation du complexe II active les caspases initiateuses. Si l'activation de NF- κ B par le complexe I n'induit pas une expression suffisante de protéines anti-apoptotiques, les caspases initiateuses sont activées, induisant l'apoptose et l'inhibition de RIP1 par clivage. Cependant, si les caspases sont inhibées, l'activation des récepteurs de mort par leurs ligands induit une mort cellulaire nécrotique médiée par RIP1.

Une autre voie d'activation de la nécrose implique PARP-1 (Figure I-8). Les dommages de l'ADN produits par des ROS ou des agents d'alkylation tel que MNNG (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) induisent une activation de PARP-1. Cette dernière catalyse la poly-(ADP-ribosylation) des protéines nucléaires cibles par hydrolyse de la partie ADP-ribose du

NAD^+ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). Cette hydrolyse se fait de manière ATP-dépendante³². Une augmentation des dommages de l'ADN provoque une suractivation de PARP-1 ce qui induit, par la suite, une activation de la protéine JNK grâce et de manière dépendante aux protéines RIP1 et TRAF2³³. L'activation de JNK induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale médiée par Bax et les protéases calpain/cathepsin. La protéine AIF est alors clivée et larguée dans le cytosol, puis se transloque dans le noyau. Une fois dans le noyau, AIF forme un complexe de dégradation de l'ADN avec l'histone H2AX et la cyclophilin A, conduisant à un clivage de l'ADN en grands fragments. Ces nouveaux dommages à l'ADN conduisent à un cercle vicieux de phénomènes nécrotiques par suractivation de PARP-1³⁴.

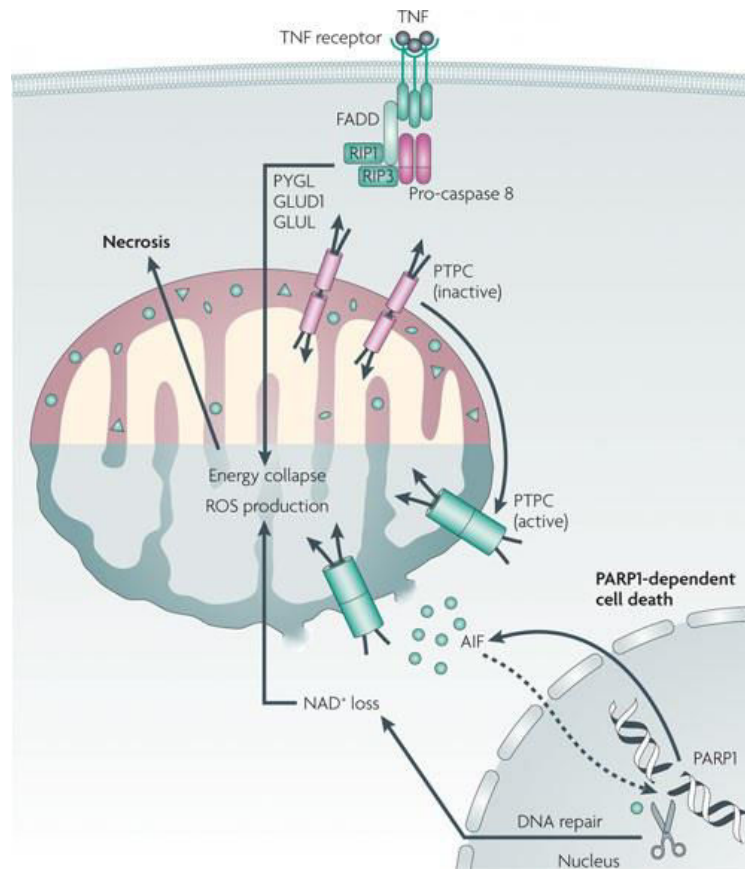


Figure I-8. Voie nécrotique³⁵. La nécrose peut être induite par une activation des TNFR ou par une suractivation de PARP-1.

Plusieurs molécules de la PDT sont connues pour induire une mort cellulaire par nécrose. Une excitation des PS localisés dans la membrane plasmique provoque une perte d'intégrité de la membrane plasmique donc une nécrose³⁶. De même, l'activation des PS situés dans les

lysosomes peut perturber la membrane lysosomale et provoquer la libération de protéases lysosomales dans le cytosol, ce qui conduit à une mort cellulaire nécrotique³⁷.

C- Photosensibilisateurs

1.- PS de première génération

Les PS de première génération sont des porphyrines comprenant des hématorporphyrines (Hp) et leurs dérivés (Figure I-9). Les porphyrines d'origine naturelle ont un noyau tetrapyrrole entièrement conjugué (non réduit) auquel sont reliés un ou plusieurs groupes latéraux dont le nombre et le type peuvent varier. Elles jouent un rôle biologique, notamment dans le transport de l'oxygène lorsqu'elles possèdent un atome de fer. Les Hp ont d'abord été isolées à partir d'hémoglobine. Une purification et une solubilisation des Hp conduisent à une préparation du dérivé HpD constitué d'un mélange de Hp et de protoporphyrines. Puis une purification supplémentaire aboutit à la préparation de porfimer sodium (Photofrin[®]) qui est un mélange de porphyrines de formes oligomériques et monomériques. La purification de ces mélanges n'est pas constante ; on obtient des productions avec des ratios des divers constituants différents d'un lot à l'autre.

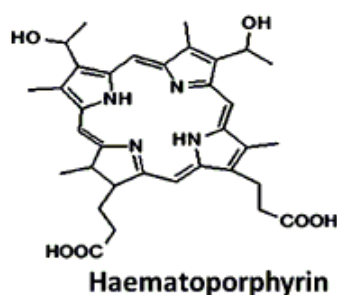


Figure I-9. Structure de la base des hématorporphyrines.

HpD et Photofrin[®] sont les premiers PS connus et ayant permis une large expansion de la PDT. Cliniquement, ces deux molécules se concentrent dans les tissus dont les cellules ont une forte croissance, comme les tumeurs ou la peau, avec une légère préférence pour les tumeurs. Photofrin[®] peut aussi s'internaliser dans d'autres tissus sains et devenir toxique pour ceux-ci³⁸. L'importante concentration dans les cellules de la peau provoque une forte

sensibilisation à la lumière du jour imposant aux patients une protection à l'obscurité pendant plusieurs semaines. Le traitement nécessite un temps long et une ou plusieurs irradiations à 630 nm avec une fluence de 100-300 J/cm² de 24h à 72h après l'injection (intraveineuse). Ces contraintes sont dues à la faible absorption (λ_{abs}) de ces molécules et une faible production d'oxygène singulet³⁹.

Les contraintes et inconvénients apportés par l'utilisation des PS de première génération ont conduit à la définition du PS idéal.

2.- PS idéal

Pour une utilisation clinique optimale, les PS doivent répondre à des critères chimiques, photophysiques et biologiques spécifiques. Certaines caractéristiques sont préférables pour assurer un meilleur confort dans la production et l'utilisation de ces molécules⁴⁰. La synthèse et la purification des PS doivent être efficaces, simples et rapides pour assurer des lots de production identiques. Les produits doivent être stables chimiquement et photochimiquement pour éviter une photodégradation. L'intervalle de temps entre l'injection du PS et l'illumination doit être court afin de limiter le temps de traitement à un ou deux jours. D'autres caractéristiques sont considérées comme essentielles :

- le PS ne doit pas présenter de toxicité à l'obscurité pour la gamme de concentration utilisée pour la PDT, ni de génération de produits de dégradation toxiques générés par photodégradation ou métabolisation cellulaire ; ainsi qu'une très faible sensibilité à la lumière du jour.
- le PS ne doit pas générer de douleur chez le patient, qu'il soit à l'obscurité ou excité. Il ne doit pas non plus causer d'allergies.
- l'élimination de PS par l'organisme doit être rapide par photodégradation, métabolisation ou excrétion, afin de minimiser la période de photosensibilisation.
- amphiphilicité : la solubilité pour le transport et l'hydrophobicité pour l'internalisation. Le PS doit être soluble pour pouvoir être transporté dans le système sanguin sans former d'agrégats ou de précipité. Le PS doit aussi être lipophile pour se fixer et pénétrer dans la bicouche lipidique des membranes des cellules de la tumeur ou de sa vasculature.

- sélectivité pour les tissus cibles : le PS doit s'accumuler dans les tissus cibles mais pas dans les cellules saines. Cependant, aucun PS actuel ne s'accumule spécifiquement dans les cellules cancéreuses, même si la plupart d'entre eux montre une accumulation préférentielle dans les tissus tumoraux par rapport aux muscles ou la peau. Ces phénomènes semblent être causés par la physiologie anormale des tumeurs : faible drainage lymphatique dans les tumeurs, abondance des macrophages, fenestration des vaisseaux tumoraux, faible pH dans le compartiment extracellulaire de la tumeur, augmentation de l'expression des récepteurs aux LDL (low-density lipoprotein) entraînant une forte affinité du PS pour les cellules cancéreuses/endothéliales prolifératives.
- le PS doit avoir un coefficient d'extinction molaire élevé pour minimiser la dose de PS et de lumière nécessaire pour obtenir l'effet escompté.
- le PS doit absorber à des longueurs d'onde situées dans la fenêtre photothérapeutique (600-850 nm) afin de minimiser autant que possible les phénomènes d'absorption et de diffusion de la lumière par l'environnement, assurant ainsi une meilleure pénétration dans les tissus.

Afin de respecter au mieux les caractéristiques du PS idéal, une deuxième génération de PS a été élaborée.

3.- PS de deuxième génération

Contrairement aux PS de première génération, les Ps de deuxième génération sont des composés purs synthétisés chimiquement (Figure I-10). Ils possèdent de forts pics d'absorption situés dans des régions très rouges du spectre (660-700 nm) ou dans le proche infrarouge (700-850 nm). A ces longueurs d'onde, la lumière pénètre plus en profondeur dans les tissus car elle est moins absorbée par les constituants tissulaires et diffuse moins. Des modifications chimiques ont été apportées sur ces PS de deuxième génération afin d'améliorer leur solubilité ; des groupements polaires ont été ajoutés aux noyaux hydrophobes de ces molécules, les rendant plus amphiphiles.

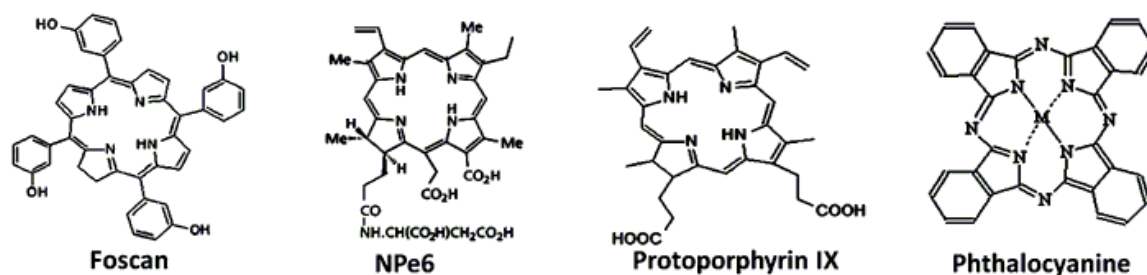


Figure I-10. Structure de certains PS de deuxième génération approuvés cliniquement.

Des améliorations sont aussi à noter dans l'intervalle de temps entre l'administration du PS et le traitement par la lumière, qui passe de 24h-72h pour les PS de première génération à 1h-6h en moyenne pour les PS de deuxième génération, même si cet intervalle reste toujours long pour certaines molécules (Tableau 1)⁴¹. Ces molécules sont rapidement éliminées des tissus sains, ce qu'on appelle la clairance, permettant de diminuer le temps de sensibilité à la lumière du jour. De plus, il n'y a pas ou très peu de toxicité à l'obscurité pour la peau et les organes internes. Les PS de deuxième génération sont principalement des chlorines, bactérochlorines ou phtalocyanines.

	λ_{abs} (nm)	Coefficient d'extinction molaire (M^{-1}/cm)	Dose de drogue (mg/kg)	Dose de lumière (J/cm^2)	Délais avant l'irradiation (h)	Temps de la photosensibilisation
Haematoporphyrin derivative (HpD)	630	3×10^3	2,0 - 5,0	75 - 200	24 - 48	2 - 3 mois
Porfimer sodium (Photofrin®)	630	$3,5 \times 10^3$	2,5 - 3,0	75 - 200	24 - 48	1 - 2 mois
Benzoporphyrin derivative (BPD-MA)	690	$1,3 \times 10^4$	0,15 - 0,5	100 - 200	0,5 - 2,5	4 - 7 jours
Mono-L-aspartyl-chlorin e6 (NPe6)	654	4×10^4	0,5 - 3,5	25 - 100	0,5 - 2,5	3 - 7 jours
Tin ethyl etiopurpurin (SnET2)	660	$2,8 \times 10^4$	1,0 - 2,0	100 - 300	24	jusqu'à 1 mois
Mesotetrahydroxyphenyl chlorin (m-THPC)	652	3×10^4	0,1 - 0,3	8 - 12	24 - 48	jusqu'à 6 semaines
Lutetium texaphyrin (Lu-tex)	732	$4,2 \times 10^4$	0,6 - 7,2	150	3 - 5	jusqu'à 7 jours
Zn(II)-phtalocyanine (Zn-II-Pc)	675	$2,5 \times 10^5$	0,5 - 2,0	70 - 150	24 - 72	8 - 10 jours
Naphtalocyanines	760	$> 10^5$	0,3 - 0,5	200 - 450	24	3 jours
Acide-5-aminolévulinique (ALA)	635	$> 2 \times 10^5$	20%	10 - 150	4 - 18	1 - 2 jours

Tableau 1. Principales propriétés photochimiques et photobiologiques de certains PS disponibles en clinique⁴¹.

Parmi ces PS, une molécule agit de manière particulière : ALA (acide-5-aminolévulinique, Levulan®). En effet, ce n'est pas un PS en soi mais il est métabolisé par la cellule en protoporphyrine IX (Pp IX) dans la cellule ; c'est cette Pp IX qui est photosensible. L'ALA est synthétisé et métabolisé en Pp IX de manière naturelle dans la cellule saine, où le Pp IX a un rétrocontrôle négatif sur sa production. Une forte concentration d'ALA exogène dans la

cellule inhibe le rétrocontrôle, ce qui provoque une augmentation de Pp IX. L'ALA pénètre dans les cellules par des transporteurs actifs consommateurs d'énergie, rapidement saturables et lent, même pour les cellules tumorales^{42,43}. Pour pallier cette contrainte, un dérivé méthylé a été synthétisé : le MAL (methyl-aminolevulinic acid). MAL est plus lipophile et pénètre dans les cellules par des transporteurs actifs insaturables⁴⁴. Une fois dans la cellule, MAL est déméthylé par les enzymes cellulaires en ALA et métabolisé en Pp IX. ALA et MAL sont administrés de manière topique pendant plusieurs heures, conduisant à une plus forte accumulation dans les cellules tumorales. Une administration systémique provoque des troubles gastro-intestinaux. Pp IX possède un pic d'absorption à 405 nm et d'autres bandes d'absorption plus faibles (Q-bands) à 510, 545, 580 et 630 nm (10 à 20 fois plus faibles que celle à 405 nm). Une excitation à 405 nm induit une forte production d'oxygène singulet permettant un temps de traitement court. En revanche, une excitation entre 625 et 633 nm induit une moins bonne production d'oxygène singulet, ce qui conduit à un temps de traitement plus long, mais à des longueurs d'onde plus pénétrantes.

Le BPD-MA (benzoporphyrin derivative monoacid ring A), aussi appelé verteporfin ou Visudyne[®], est un dérivé de benzoporphyrine considéré comme un modèle exemplaire pour la PDT. Ce PS est mondialement utilisé pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), une maladie ophtalmique pouvant provoquer une cécité. Il est aussi efficace pour le traitement d'astrocytome ophtalmique, mélanome choroïdien et diverses tumeurs cutanées malignes.

Les texaphyrines sont des analogues de porphyrines très hydrophiles, pouvant être complexés avec des cations métalliques, leur permettant une très bonne efficacité de production d'oxygène singulet. Parmi eux, on trouve le Lu-tex (ou Lutryn[®]), un texaphyrine avec un cation lutécium Lu(III). Il possède une forte absorption à 732 nm permettant une meilleure pénétration dans les tissus.

Les chlorines ont un coefficient d'extinction molaire élevé, un pic d'absorption dans la région très rouge du spectre, une accumulation rapide et sélective dans les tissus cibles, ainsi qu'une très bonne efficacité de production d'oxygène singulet. NPe6 (mono-L-aspartyl-chlorin e6) est un composé hydrophile avec une fluorescence permettant de visualiser le tissu cible. Le mTHPC (meso-tetra hydroxyphenylchlorin), aussi appelé temoporfin ou Foscan[®], est un très bon inducteur d'oxygène singulet à 652 nm. Il donne de très bonnes réponses pour

le traitement des cancers de la tête et le cou, dont les lèvres et la cavité orale ; mais il cause une forte sensibilité à la lumière du jour pendant plusieurs semaines.

Les bactériochlorines ont un coefficient d'extinction molaire des plus élevés (environ 150 000 M⁻¹/cm). Leur forte absorption aux alentours de 780 nm augmente l'efficacité de la PDT dans les tumeurs pigmentées.

Les naphthalocyanines ont une structure de base porphyrique avec un atome central de zinc, silicium ou d'aluminium permettant une meilleure production d'oxygène singulet. Ces PS possèdent une forte absorption autour de 670 nm et une bonne fluorescence.

De nombreux PS de deuxième génération sont utilisés en clinique ou sont sujets à des essais cliniques en cours, démontrant une amélioration de ces molécules par rapport aux PS de première génération. Cependant, la sélectivité des PS pour les tissus cibles reste à améliorer. En effet, même les PS de deuxième génération présentent des contraintes de protection à l'obscurité pour éviter une phototoxicité à la lumière du jour, causée par une internalisation des PS dans les tissus sains. La conception des PS de troisième génération a pour objectif d'améliorer ce point.

4.- PS de troisième génération

Les PS de troisième génération sont des PS de première ou deuxième génération modifiés, conjugués ou vectorisés afin d'améliorer leur sélectivité vis-à-vis des tissus cibles. Plusieurs stratégies de ciblage ont été mises au point, classées en deux catégories : ciblage passif et ciblage actif. Le ciblage est passif lorsqu'il est réalisé par les caractéristiques physicochimiques du PS, et il est actif lorsqu'il est assuré par une molécule vectrice.

a) Ciblage passif

Pour le ciblage passif, plusieurs types de vecteurs peuvent être utilisés, comme les liposomes et les nanoparticules.

Les liposomes sont des vésicules amphiphiles unilamellaires ou multilamellaires composés de phospholipides et de cholestérol. Ils peuvent incorporer des PS lipophiles et hydrophiles. Grâce à leur caractère amphiphile, les liposomes circulent mieux dans le système sanguin et dans le milieu interstitiel que les PS susceptibles de s'agréger. Certains PS présentent une amélioration pour le traitement lorsqu'ils sont administrés sous forme liposomale. C'est le cas de Photofrin[®] qui présente une meilleure incorporation et une plus grande efficacité d'induction de nécrose tumorale lorsqu'il est sous forme liposomale⁴⁵. D'autres systèmes liposomaux ont été étudiés en PDT, ayant montré une amélioration de l'internalisation cellulaire et une diminution de l'agrégation des PS. Néanmoins, les systèmes liposomaux présentent quelques inconvénients. En effet, ils ont une demi-vie plasmatique faible, diminuant leur efficacité en tant que vecteur. Cette caractéristique est due à une forte susceptibilité à leur désintégration par fixation aux HDL (high-density lipoprotein) et à leur digestion par les macrophages.

Les nanoparticules (NP) utilisées en PDT sont inorganiques, afin d'éviter leur dégradation enzymatique trop rapide dans le système sanguin. Les PS peuvent y être insérés de manière covalente ou chimique. La taille des NP joue un rôle important pour le ciblage. En effet, il est préférable d'avoir des NP de taille inférieure à 100 nm afin de faciliter leur passage dans les vaisseaux fenêtrés de la tumeur et entre les cellules endothéliales de ces vaisseaux pour rejoindre le milieu interstitiel. Les caractéristiques spécifiques des NP étudiées pour la PDT doivent répondre à plusieurs critères⁴⁶ :

- elles doivent être biodégradables
- elles doivent être photostables
- elles doivent être non-immunogènes
- pour les NP non-biodégradables, la taille des pores peut être contrôlée, avec une taille optimale pour éviter que le PS ne sorte et pour laisser entrer l'oxygène nécessaire à la réaction photochimique (entre 0,5 et 1 nm)
- la NP peut être fonctionnalisée en greffant à sa surface des molécules la rendant plus hydrophile, hydrophobe ou amphiphile, ou des groupements d'adressage spécifique aux cellules cancéreuses, considéré comme un ciblage actif.

b) Ciblage actif

Le ciblage actif des cellules tumorales en PDT est assuré par des molécules ayant une forte affinité pour des marqueurs (antigène ou récepteur) surexprimés à la surface des cellules tumorales. Le ciblage actif peut également permettre de diriger le PS vers un compartiment cellulaire plus ou moins sensible à l'action photodynamique.

Anticorps monoclonaux :

L'utilisation d'un PS couplé à un anticorps ciblant spécifiquement les tissus cancéreux est appelée photoimmunothérapie. Le couplage d'un anticorps à un PS présente quelques problèmes gênant leur internalisation. La taille élevée d'un anticorps (IgG \approx 150 kDa, IgM \approx 900 kDa) est le premier problème rencontré ; la taille est bien trop élevée pour que l'internalisation soit possible. Pour pallier ce problème, seuls des fragments d'anticorps préalablement générés sont greffés au PS. De plus, un espaceur entre le PS et le fragment d'anticorps est nécessaire pour une diminution de la gêne stérique et donc une optimisation des fonctions de chacune de ces parties⁴⁷. Ces fragments peuvent aussi être couplés à des NP de transport de PS⁴⁸.

Récepteurs-ligands :

Les cellules en forte prolifération, comme les cellules cancéreuses, surexpriment des récepteurs jouant un rôle important dans le métabolisme accéléré de ces cellules, comme les récepteurs de la transferrine ou de l'acide folique. Des couplages covalents de molécules se liant à ces récepteurs aux PS ont déjà fait l'objet d'étude de ciblage et démontré une phototoxicité plus forte que pour les PS seuls. C'est le cas de la greffe de PS couplés à l'acide folique⁴⁹.

Pour l'adressage *via* les récepteurs membranaires, des protéines sériques ou des peptides peuvent aussi être couplés aux PS. Parmi les protéines sériques, on trouve la transferrine et les lipoprotéines. Ces dernières permettent le transport des lipides très hydrophobes dans l'organisme. Les lipoprotéines les plus importantes sont les LDL. Les récepteurs aux LDL interviennent dans le transport de molécules physiologiques et de molécules thérapeutiques dans la cellule par endocytose. Ces récepteurs sont surexprimés à la surface des cellules cancéreuses, mais sont également exprimés dans d'autres types cellulaires, comme le foie et la glande surrénale. Il a été démontré que le ciblage aux récepteurs aux LDL est efficace pour l'internalisation des PS hydrophobes⁵⁰. C'est le cas de la chlorine e6 qui a montré une

spécificité d'internalisation et une augmentation de sa phototoxicité *in vitro* lorsqu'elle est couplée aux LDL de manière covalente⁵¹. De même, des naphthalocyanines incorporées dans le cœur de LDL montrent une accumulation préférentielle dans les tissus tumoraux⁵².

Les peptides pouvant être couplés aux PS ciblent par exemple les récepteurs aux facteurs de croissance (EGF, epidermal growth factor), les intégrines ou la neuropiline. Les récepteurs aux facteurs de croissance tel que EGFR sont eux aussi surexprimés à la surface des cellules cancéreuses dû à leur métabolisme accéléré. Le couplage de l'EGF à la chlorine e6 a montré une meilleure accumulation dans la lignée surexprimant l'EGFR (MDA-MB-468) qu'avec le PS seul⁵³. De la même manière, lorsque l'EGF est greffé à des NP transportant la phtalocyanine Pc4, on observe une meilleure accumulation et une phototoxicité deux fois plus efficace dans les cellules tumorales.

Lectines :

Les lectines sont des récepteurs membranaires reconnaissant spécifiquement les groupements osidiques (sucres), guidant les ligands glycosylés vers différents compartiments cellulaires (lysosome, endosome, appareil de Golgi). Certaines cellules cancéreuses surexpriment ces récepteurs. Des études *in vivo* ont montré une amélioration de l'action photodynamique et une accumulation préférentielle dans les cellules tumorales d'une porphyrine triglycosylée (m-TPP(Glu)₃) par rapport à la molécule simple mTHPC⁵⁴.

Ces différentes stratégies de ciblage permettent de limiter les dommages photoinduits à la zone ciblée. Cependant, les longueurs d'ondes actuellement utilisées ont une faible pénétration tissulaire ; c'est pourquoi il est nécessaire de trouver des PS absorbant dans la région proche de l'infrarouge voire dans l'infrarouge.

5.- PDT dans l'infrarouge

L'excitation dans le NIR ou l'infrarouge présente un avantage majeur pour la PDT. En effet, contrairement aux longueurs d'onde de l'UV-visible, les longueurs d'ondes du NIR-infrarouge sont moins diffusibles et plus pénétrantes. Ces caractéristiques sont dues à l'absorption des fluorophores intrinsèques (cellulaires et tissulaires) dans l'UV-visible. Cependant, au-delà de 930-950 nm, les molécules d'eau ont une forte absorption ce qui

provoque un dégagement thermique. L'utilisation de ces longueurs d'onde d'excitation permet donc d'étendre la fenêtre photothérapeutique (700-950 nm).

Il existe deux processus d'excitation dans le NIR-infrarouge en PDT : la conversion ascendante de photon (*upconversion*) et l'excitation 2-photon. Néanmoins, la façon d'atteindre l'état excité par le fluorophore diffère selon le processus d'excitation : l'absorption séquentielle concerne deux ou plusieurs photons qui permettent d'atteindre des états excités non virtuels, contrairement à l'absorption multiphoton.

a) Upconversion

La conversion ascendante de photon (*upconversion*) est le processus par lequel une molécule émet de la lumière à une longueur d'onde inférieure à la lumière absorbée. Ainsi, le déplacement de Stokes est négatif (déplacement anti-Stokes). Des NP ou des *quantum dots* sont synthétisées pour absorber dans des longueurs d'ondes proche de l'infrarouge ou dans l'infrarouge. Ces NP sont généralement des nanocristaux chargés par des ions lanthanide, qui émettent des photons d'énergie élevée sous excitation dans le NIR. Ces photons émis vont permettre d'exciter les PS chargés à la surface de ces NP.

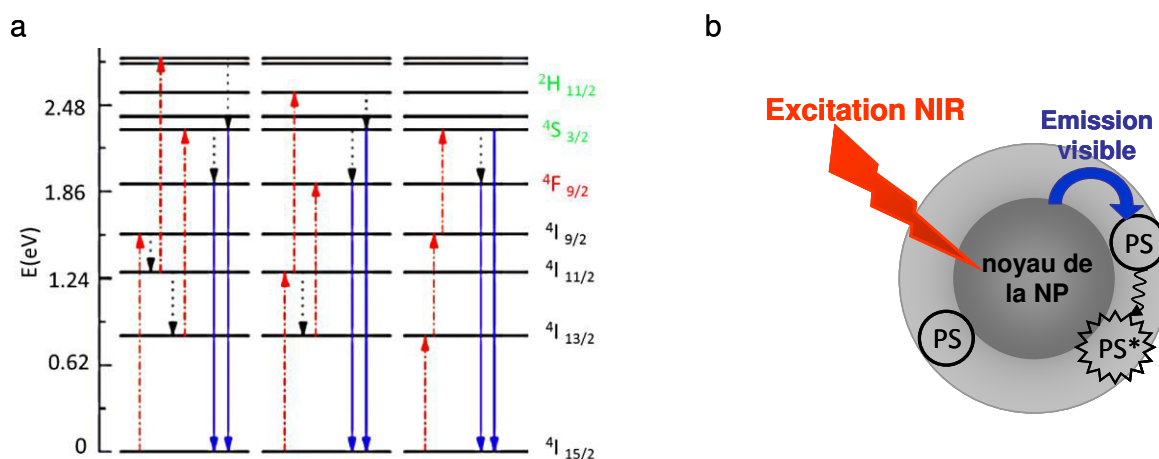


Figure I-11. Représentation de la conversion ascendante de photon (*upconversion*). (a) Diagramme des niveaux énergétiques d'un élément de la série lanthanide (Er^{3+}) et du processus de *upconversion*. Les flèches rouges, noires et bleues correspondent, respectivement, aux processus d'excitation, de relaxation et d'émission. (b) Schéma d'une nanoparticule (NP) avec un noyau lanthanide et une surface chargée de PS.

Il existe plusieurs stratégies de couplage des NP et des PS. L'une d'elles consiste à recouvrir les NP d'une couche de silice mésoporeuse dans laquelle les PS sont chargés. C'est

le cas de NP de NaYF₄ recouvertes d'une couche de silice dans laquelle est chargée la phthalocyanine ZnPc⁵⁵. Une excitation de ces NP à 980 nm entraîne une émission de celles-ci (~ 660 nm) d'énergie suffisante à l'excitation de ZnPC. Ces NP-ZnPc ont montré une efficacité dans la production de ROS et l'induction de l'apoptose *in vitro* et *in vivo*. Une autre stratégie de couplage des NP et des PS consiste à greffer des polymères amphiphiles à la surface des NP, comme le polyéthylène glycol, auxquels sont fixés des PS de manière covalente ou non covalente. C'est le cas de la chlorine 6 qui peut-être fixée au polyéthylène glycol greffé à des NP⁵⁶ de manière covalente par une liaison amide, ou de manière non covalente par interactions hydrophobes⁵⁷. L'extrémité libre des molécules de polyéthylène glycol peut servir d'ancrage pour la fixation de molécules de ciblage des NP.

b) 2-photon

L'utilisation d'un laser pulsé nécessaire à l'excitation biphotonique permet de confiner la zone d'excitation à un point focal, ce qui permet un contrôle spatial de la zone d'activation des PS.

La structure des PS ayant déjà été médicalement approuvés ne permet pas une absorption 2-photon ; par exemple Pp IX a une section efficace 2-photon d'environ 2 GM et le Photofrin[®] de 7,4 GM à 850 nm. Ces faibles valeurs obligent un temps d'irradiation très long (4h), ce qui fait de ces molécules de mauvais candidats pour la PDT 2-photon⁵⁸. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles molécules ayant une meilleure section efficace 2-photon (σ^2)⁵⁹.

Au départ, des études ont été réalisées sur des molécules porphyriques dimérisées afin d'améliorer leur efficacité d'absorption 2-photon. Ces études ont montré une augmentation significative des σ^2 (8000-17000 GM), mais la plupart des dimères de porphyrine présente un problème de solubilité. Dans un deuxième temps, des équipes de recherche ont essayé d'améliorer la solubilité des PS à absorption 2-photon. Des porphyrines conjuguées ont été synthétisées de sorte à avoir un bon σ^2 (8000-33000 GM) et une bonne solubilité. Certaines de ces molécules ont montré une efficacité sur des cellules HeLa⁵⁸. Cependant, d'autres stratégies ont été mises en place pour améliorer la PDT par excitation 2-photon faisant intervenir des NP chargées de PS⁶⁰. En effet, des NP de silice organiquement modifiée (ORMOSIL) chargées de PpIX ont montré une efficacité pour l'imagerie et la PDT 2-photon sur les cellules HeLa²¹.

Des études récentes ont décrit des dérivés de molécules connues et ayant une utilisation différente des PS comme des candidats potentiels pour la PDT 2-photon. Effectivement, des dérivés de la Coumarine ont montré une efficacité dans la production de ROS et l'induction de mort cellulaire dans les cellules HepG2⁶¹. Toutefois, des problèmes de solubilité de ces dérivés restent irrésolus.

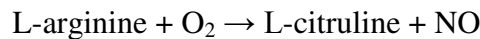
II – Etude des Nanotriggers pour une production de NO photo-induite

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre naturellement produit par les organismes mammifères, dans lesquels il a une fonction de médiateur. Cette molécule gazeuse très réactive joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire, la pression artérielle systémique et pulmonaire, le remodelage vasculaire et l'angiogénèse. Dans le système cardiovasculaire, NO est responsable de la vasodilatation ; il est alors considéré comme un vasodilatateur endogène⁶². Dans les tumeurs, NO participe à de nombreux processus anormaux dans la vascularisation tumorale, comme la néo-angiogénèse ou l'absence de réponse aux médiateurs vasoactifs⁶³. De plus, NO joue un rôle différentiel dans les tumeurs selon qu'elles soient solides ou systémiques. Lorsque NO est produit à de fortes concentrations, principalement dans les tumeurs systémiques, il a une activité antitumorale ; lorsqu'il est produit à de faibles concentrations, principalement dans les tumeurs solides, il favorise la croissance tumorale. La régulation du niveau de NO intervient dans de nombreux processus (patho)physiologiques dans les systèmes cardiovasculaires, nerveux et immunitaires. La toxicité du NO et son rôle dans les pathologies sont notamment dus à sa réactivité avec l'ion superoxyde, formant ainsi le peroxydite, un oxydant très puissant. Dans le système sanguin, NO inhibe l'agrégation des plaquettes, ce qui inhibe leur adhésion aux fibres de collagène, à la matrice extracellulaire et à la couche de cellules endothéliales^{64,65}. Ainsi, une diminution de la production de NO peut conduire à une augmentation de l'adhésion des plaquettes sur les parois des vaisseaux, comme il a été observé dans certains cas de diabète et d'athérosclérose⁶⁶. Aussi, une absence de NO peut être impliquée dans la resténose, comme il est souvent observé après une angioplastie⁶⁷. Il est donc important de contrôler le niveau de production de NO.

A- NO Synthase

1- Isoformes

La NO Synthase (NOS) représente une famille d'enzyme catalysant la production de NO, en utilisant le dioxygène et le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) comme co-substrats, selon la réaction suivante :



Cette réaction d'oxydation se fait en parallèle à l'oxydation du NADPH en NADP⁺.

Il existe trois isoformes de la NOS chez les mammifères. La nomenclature la plus communément utilisée suit l'ordre chronologique de leur découverte :

- nNOS : aussi connue sous le nom de type I, NOS-I ou NOS-1. C'est le premier isoforme découvert. Elle est prédominante dans les tissus neuronaux et les muscles squelettiques.
- iNOS : aussi connue sous le nom de type II, NOS-II ou NOS-2. C'est l'isoforme inductible, présente dans différents types cellulaires et tissulaires, comme les systèmes immunitaire et cardiovasculaire.
- eNOS : aussi connue sous le nom de type III, NOS-III ou NOS-3. C'est l'isoforme découverte dans les cellules endothéliales. Elle est aussi présente dans les plaquettes, les myocytes cardiaques et le cerveau (hippocampe)⁶⁸.

Une terminologie plus biochimique est aussi utilisée, regroupant les eNOS et nNOS sous le terme de NOS constitutives du fait de leur expression généralement à l'état de base de la cellule. La iNOS est dite inductible due à l'induction de son expression par des *stimuli* immunitaires.

Il existe des différences dans la séquence et la structure de ces trois isoformes, mais la structure principale reste conservée.

2- Structure

La NOS est constituée d'un domaine réductase (C-terminal) et d'un domaine oxygénase (N-terminal) (Figure I-12).

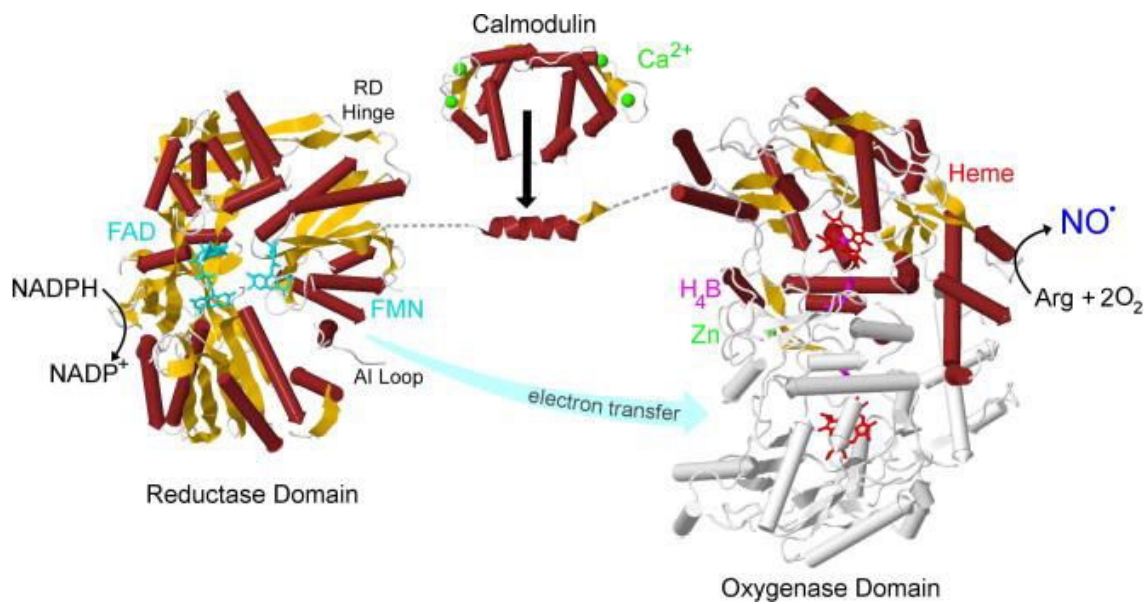


Figure I-12. Structure quaternaire de la NOS.⁶⁹

Dans le domaine réductase, se trouvent les sites de fixation du NADPH et des co-facteurs FAD (Flavine Adénine Dinucléotide) et FMN (Flavine Mono Nucléotide). Ce domaine présente 30% à 40% d'homologie avec le cytochrome P450 réductase. Le domaine oxygénase est principalement constitué du site de fixation de l'hème (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH₄) jouant le rôle de co-facteur et de la L-Arginine. Les domaines oxygénase et réductase sont reliés par un segment polypeptidique d'environ 30 acides aminés, formant le site de liaison de la calmoduline (CaM)⁷⁰⁻⁷². La CaM interagit alors de manière directe avec le FMN et l'hème BH₄. Sa fixation stimule le transfert d'électron, principalement au niveau du passage du domaine réductase au domaine oxygénase, et ainsi la production de NO.

Les NOS sont actives sous forme d'homodimères. Les domaines oxygénases de chaque monomère sont impliqués dans la dimérisation. Cette conformation implique que le domaine réductase d'un monomère transfère l'électron au domaine oxygénase de l'autre monomère (Figure I-13).

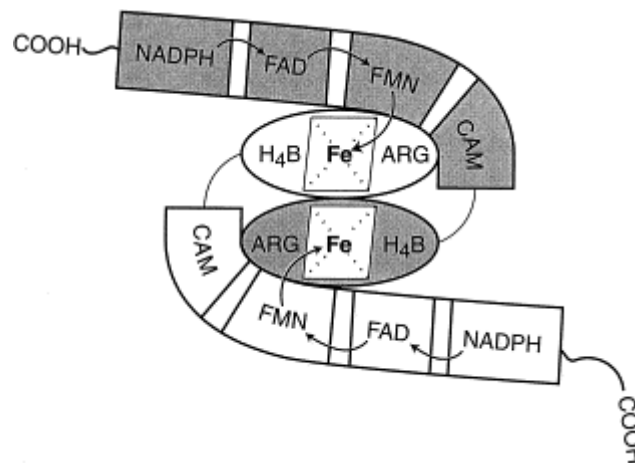


Figure I-13. Transfert d'électron à travers la iNOS homodimérique⁷³.

B- Mécanisme de production de NO

1- Transfert d'électron dans le domaine réductase

Le rôle essentiel des flavines est de permettre le transfert d'électron à partir d'un donneur de deux électrons (NADPH) à un accepteur d'un électron (hème). L'activité catalytique du domaine réductase peut être divisé en trois étapes basiques. L'étape (1) implique le transfert d'électron du NADPH au FAD. Lorsque le NADPH se fixe sur son site dans le domaine réductase, il est en contact direct avec certains résidus du FAD, auquel il fournit un ion hydruure au FAD. Le FAD devient alors une hydroquinone et transfère un électron au FMN, il s'agit de l'étape (2). Le mécanisme exact de cette étape est encore mal connu, due à la difficulté d'observer un phénomène aussi rapide. Selon des études de modélisation récentes⁷⁴, la fixation du NADPH sur son site verrouille l'enzyme dans une conformation où le FMN est très proche des domaines FAD et NADPH. Cette courte distance entre FAD et FMN (jusqu'à 5 Å pour la iNOS⁷⁵) facilite le transfert d'électron entre les deux flavines. L'étape (3) consiste à transférer un électron du FMN à l'hème. Cependant, lorsque le FMN est dans la configuration de l'étape (2), il est incapable de transférer efficacement l'électron à l'hème ; il doit se déplacer sensiblement pour se rapprocher de l'hème. Le transfert du domaine réductase au domaine oxygénase requiert donc une transition conformationnelle, impliquant un déplacement du domaine FMN, qui s'éloigne du domaine FAD et se rapproche de la région charnière des domaines réductase et oxygénase.

2- Calmoduline

La liaison de la CaM à la NOS a de multiples effets. En se liant à son domaine de fixation, elle le protège de l'attaque des protéases. Aussi, elle accélère l'oxydation du NADPH par la flavine et le transfert de ces électrons vers des accepteurs exogènes tels que le dioxygène, le ferricyanure ou le cytochrome c. Il a aussi été démontré que les trois étapes de l'activité catalytique du domaine réductase dépendent de la conformation de l'enzyme, selon que la région charnière soit ouverte ou fermée⁷⁶. Cela implique que les fonctions du domaine réductase dépendent du mouvement d'articulation pour induire chaque étape. Par conséquent, chaque étape est susceptible d'être CaM-dépendante⁶⁹. Toutefois ce sujet est controversé suivant l'interprétation donnée aux études de cinétiques précédemment réalisées^{77,78}. Les mécanismes généralement proposés font surtout référence au rôle de la CaM sur l'accélération du changement conformationnel nécessaire à l'étape (3)⁷⁵. Donc le rôle le plus important de la CaM est celui qu'elle joue dans l'activation des NOS, en permettant le transfert d'électrons du domaine réductase au domaine oxygénase.

La séquence du site de fixation de la CaM diffère entre les trois isoformes. La CaM se fixe à l'isoforme inductible, iNOS, de manière indépendante au Ca^{2+} et avec une plus grande affinité. La CaM et la iNOS constituent ainsi un complexe très stable où la CaM pourrait être apparentée à un troisième domaine de la iNOS. La réponse de l'activité de la iNOS est donc peu ou pas dépendante du Ca^{2+} .

Les isoformes constitutifs, nNOS et eNOS, sont eux régulés par la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, qui induit la fixation de la CaM sur les enzymes. Dans les nNOS et eNOS, il existe deux régions peptidiques additionnelles (AI et CT). Des mutations sur ces régions ont permis de déterminer leur rôle :

- le peptide AI (*autoinhibitory loop*) est situé au niveau du domaine FMN. Une délétion de cette boucle conduit à une fixation de la CaM à de plus faibles concentrations de Ca^{2+} et à l'augmentation de l'activité du domaine réductase en absence de CaM⁷⁹
- le peptide CT (C-Terminal) est situé au niveau C-terminal de la NOS. Une délétion de cette région a des effets similaires et induit l'activité de synthèse de NO en absence de CaM⁸⁰.

Une délétion de ces deux régions a pour conséquence une forte augmentation de l'activité réductase et de la NOS en absence de CaM. En outre, l'insertion des régions AI et CT semblent augmenter la surface de contact entre FAD et FMN. De plus, il a été démontré dans

une construction constituée uniquement du domaine FMN et de l'hème, que le taux de transfert d'électron entre ces deux domaines reste dépendant de la CaM, même en l'absence du FAD^{74,81}. Il est donc clair que l'activité des NOS constitutives est très liée à la fixation de la CaM.

3- Synthèse de NO dans le domaine oxygénase

Le domaine oxygénase est le domaine où la synthèse de NO se produit. Le substrat L-arginine, en présence de dioxygène (O₂), est convertit en L-citrulline et NO par le domaine oxygénase de la NOS suivant deux réactions de mono-oxydation consécutives (Figure I-14).

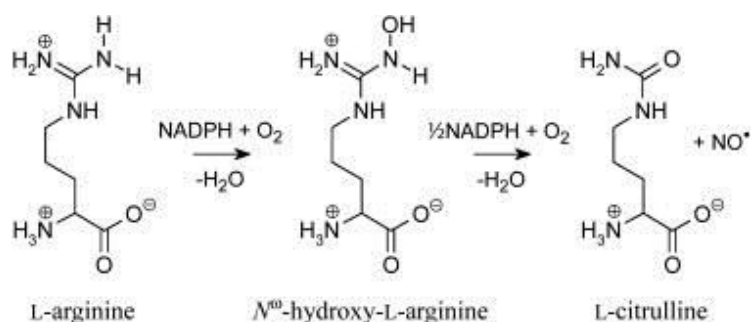


Figure I-14. Production de NO à partir de deux réactions de mono-oxydation.⁶⁹

La première réaction consiste en l'oxydation de la L-arginine à partir d'un atome d'oxygène du O₂. Elle requiert le transport de deux électrons du domaine réductase à l'hème. La seconde étape ne consomme qu'un électron et fait aussi intervenir O₂ pour la production de L-citrulline et de NO⁶⁹. Ces deux réactions commencent par la fixation d'O₂ à l'hème ferreux, suivi d'une réduction par un électron apporté par BH₄. BH₄ joue plusieurs rôles dans l'activité de la NOS. Il se fixe à l'interface dimérique et aide à la stabilisation de cette structure quaternaire. Il joue aussi un rôle de co-facteur crucial dans la production de NO. Durant la synthèse de NO, BH₄ possède un double rôle : il est à la fois accepteur et donneur d'électron. Suite à la formation du complexe oxyferreux, BH₄ intervient comme donneur d'électron. Cette étape est nécessaire à l'activation de l'oxygène pour les deux réactions de mono-oxydation. Ces deux réactions aboutissent à la formation de L-citrulline, mais aussi à la formation d'un complexe nitrosyle ferreux. Ce dernier possède une très forte affinité pour le

NO et un potentiel de réduction élevé⁸². BH₄ est aussi nécessaire à la dernière étape de la synthèse de NO. En effet, il intervient auprès du complexe nitrosyle ferreux comme un accepteur d'électron, permettant ainsi la libération de NO⁷³.

C- Localisation des NOS humaines et rôle du NO

1- Localisation tissulaire

Il a été initialement établi que les nNOS et eNOS ont une expression constitutive, tandis que la iNOS est induite par une réponse immunitaire. Cependant, des observations plus récentes ont montré que l'expression de la iNOS est constitutive dans les neurones⁸³, le rein⁸⁴, le foie⁸⁵, le poumon⁸⁶, le colon⁸⁷ et les kératinocytes⁸⁸ ; et que la eNOS peut être exprimée à plus fort niveau sous certaines conditions, comme l'exercice⁸⁹, la stimulation aux oestrogènes⁹⁰ ou l'hyperthermie⁹¹. Aussi, il semblerait que l'expression et l'activité des isoformes de la NOS soient spécifiques au type cellulaire. Toutefois, la production de NO et ses effets ne dépendent pas seulement du type de cellule, d'organe ou d'organisme où ils sont localisés, mais varient selon les conditions. Par exemple, le NO produit par les cellules endothéliales vasculaires l'est habituellement de manière constitutive et à une faible quantité, pour le maintien d'une pression et homéostasie sanguines normales⁹². En revanche, un choc septique induit une expression de la iNOS dans les cellules endothéliales vasculaires, qui produisent de fortes quantités de NO. Ce phénomène est associé à la vasoplégie, l'hypotension persistante et la décompensation⁹²⁻⁹⁴. Pour prévenir ou traiter des pathologies liées à l'augmentation, l'inhibition ou une mauvaise localisation de la production de NO, il est important de comprendre la complexité concernant la localisation de la production de NO et les effets de cette compartimentation sur les cibles cellulaires et les effets engendrés.

Dans les poumons, NO est impliqué dans de nombreux processus régulés par les différents types cellulaires. Parmi ceux-ci, il contribue à la vasodilatation de l'endothélium, la participation des macrophages dans la phagocytose et la production de mucine par les cellules épithéliales bronchiques. Ces différentes fonctions doivent être coordonnées et contrôlées pour assurer un débit sanguin et un flux d'air adéquats. NO et ses dérivés (appelés espèces réactives de l'azote) jouent un rôle important dans différentes maladies pulmonaires

inflammatoires⁹⁵. En effet, de forts taux de NO ont été trouvés dans l'air expiré par des patients atteints d'asthme^{96,97}. De plus, lors de chocs endotoxiques, NO est probablement un des principaux médiateurs moléculaires impliqués dans les changements de distribution du sang pulmonaire⁹⁸.

Les trois isoformes interviennent dans cette régulation et dans les pathologies associées. En effet, les poumons sont constitués d'au moins quarante types cellulaires différents, dont les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les macrophages, les neurones, les pneumocytes ou les cellules musculaires lisses bronchiques et vasculaires. Chacun de ces types cellulaires peut produire du NO *via* un ou plusieurs isoformes de la NOS^{99,100}. On sait qu'une augmentation du niveau de la iNOS cause une augmentation de la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales bronchiques ; alors qu'une diminution de l'expression des nNOS et eNOS entraîne une hypertension pulmonaire et une broncho-constriction spécialement dans les vaisseaux pulmonaires et les muscles lisses bronchiques.

Dans le foie, les trois isoformes sont exprimés. Leur expression et leur activité dépendent des conditions physiologiques. Dans des conditions physiologiques dites normales, la eNOS est principalement exprimée dans les cellules endothéliales des artères hépatiques, des veinules hépatiques terminales et les sinusoides⁸⁵. Cet isoforme est aussi exprimé dans les hépatocytes et les cellules épithéliales des canaux biliaires. Le NO est produit à de faibles taux et intervient dans la régulation de base du flux sanguin et les interactions cellule-cellule^{101,102}. Le rôle du NO dans les hépatocytes et les cellules épithéliales des canaux biliaires reste encore méconnu. La iNOS a d'abord été décrite comme ayant une expression inductible dans le foie¹⁰³. Cependant, des études menées *a posteriori* ont démontré une expression constitutive de la iNOS dans le foie dans des conditions physiologiques⁸⁵, avec une forte expression dans la région en périphérie de la veine porte et une diminution dans la périphérie des veines de l'acinus hépatique. L'expression constitutive de la iNOS, dans ces régions peut être stimulée par la présence d'agents chimiques et de bactéries absorbés par l'intestin et transportés au foie par la veine porte. Dans les autres régions du foie, le taux d'expression de la iNOS devient élevé sous certaines conditions, y compris l'endotoxémie, le choc hémorragique, la septicémie, l'infection, l'hépatite ou la régénération du foie. Lorsque la iNOS y est exprimée, NO est produit en grande quantité de façon persistante, jouant le rôle d'effecteur et de régulateur important pendant les processus inflammatoires et immunitaires.

Les muscles squelettiques expriment aussi les trois isoformes de la NOS : les eNOS et nNOS sont exprimées de manière constitutive, alors que la iNOS est exprimée lors de réactions inflammatoires. Chacun des isoformes a une localisation spécifique dans les fibres musculaires. La nNOS est considérée comme la principale source de NO dans le muscle squelettique. Cependant, ce n'est pas le même isoforme que celui exprimé dans le cerveau¹⁰⁴. Cet isoforme, nNOS μ , est situé dans le sarcolemme (membrane du muscle)¹⁰⁵, avec une prédominance dans les fibres musculaires de type II (à contraction rapide) par rapport aux fibres de type I (à contraction lente)¹⁰⁶. L'expression musculaire de la eNOS a d'abord été observée dans les cellules endothéliales des vaisseaux et microvaisseaux¹⁰⁶, mais elle est aussi présente au niveau du sarcoplasme^{105,107}.

Dans les muscles au repos, NO est produit à un niveau très faible¹⁰⁸. Il joue un rôle important dans la régulation physiologique du muscle squelettique, tel que le processus d'excitation-contraction, la génération de force musculaire, l'auto-régulation de la circulation sanguine, l'homéostasie calcique, le métabolisme et la bioénergétique¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Une surexpression de NO est stimulée lors d'activité ou de blessures musculaires, où il intervient de manière cruciale dans la myogenèse pour la réparation des lésions musculaires¹¹¹⁻¹¹³. De plus, il a été mis en évidence qu'une expression défectueuse de la nNOS est à l'origine de nombreuses myopathies¹¹⁴⁻¹¹⁶.

Dans le cerveau, la nNOS est exprimée dans plusieurs zones¹¹⁷. Dans le système nerveux central, la nNOS est également localisée dans les astrocytes et les vaisseaux sanguins cérébraux¹¹⁸. Cet isoforme est aussi localisé dans les neurones non-adrénergiques et non-cholinergiques périphériques qui innervent le muscle lisse du tractus gastro-intestinal¹¹⁹, ainsi que dans le corps caverneux du pénis, l'urètre et la prostate¹²⁰. L'isoforme eNOS est exprimé, dans le cerveau, au niveau des cellules endothéliales cérébrales, où il régule le débit sanguin cérébral. Dans le système nerveux périphérique, la eNOS est exprimée dans l'endothélium vasculaire et sinusoidal et dans les muscles lisses du corps caverneux humain. Dans le système nerveux central, le taux d'expression de la iNOS est faible, mais elle peut être induite dans les astrocytes et les cellules microgliales, suite à une inflammation, une infection virale ou un traumatisme.

Dans le système nerveux central, la production de NO est associée à la fonction cognitive ; intervenant dans l'induction et le maintien de la plasticité synaptique pour le contrôle du sommeil, l'appétit, la température corporelle et la neurosécrétion^{118,121,122}. Dans le système nerveux périphérique, NO régule la relaxation non-adrénergique et non-cholinergique des

cellules musculaires lisses. Ce phénomène intervient dans de nombreux processus, notamment dans la régulation du tonus musculaire des sphincters intestinaux, ou dans le péristaltisme du tractus gastro-intestinal^{123,124}. Il participe aussi à la digestion en permettant à l'estomac de recevoir un grand volume d'aliments ingérés sans aucune augmentation de la pression intraluminale.

2- Localisation subcellulaire

Le NO ayant une courte demi-vie dans les systèmes biologiques, il est nécessaire que son expression cellulaire soit compartimentée pour assurer son activité de transduction de signal à des sites cellulaires spécifiques¹²⁵. De plus, la diffusion du NO est limitée par ses interactions avec d'autres molécules dans les cellules ; donc la localisation subcellulaire des NOS affecte la diffusion du NO.

L'expression de chaque isoforme de la NOS est spécifique au type cellulaire et est située dans un compartiment subcellulaire particulier. La nNOS peut avoir une localisation subcellulaire différente selon la fonction exercée. Cet isoforme peut être localisé au niveau de la membrane plasmique par interaction directe avec celle-ci ou *via* des protéines d'ancrage. Dans le cerveau, la nNOS peut être présente sous forme de particules ou soluble¹²⁶. La forme soluble semble être localisée dans le cytosol et la forme particulaire est associée au réticulum endoplasmique. Un autre isoforme de la nNOS a été récemment identifié et localisé dans l'appareil de Golgi : nNOS β ¹²⁷.

La eNOS est exprimée à la membrane plasmique au niveau des cavéoles, où son activité est inhibée par la protéine Caveolin-1¹²⁸. Cet isoforme est aussi localisé sous forme active dans l'appareil de Golgi¹²⁹.

Comme la nNOS, la iNOS peut être sous forme soluble ou particulaire. La iNOS est décrite comme étant cytoplasmique. Sa localisation subcellulaire dépend fortement des conditions pathophysiologiques et du type cellulaire. Par exemple, dans des conditions physiologiques, les hépatocytes semblent présenter les deux formes de la iNOS dans le cytosol. Cependant, en réponse à une infection bactérienne, donc à une stimulation de l'expression de la iNOS, cet isoforme est majoritairement localisé dans les péroxysomes^{130,131}.

La iNOS peroxisomale est monomérique donc inactive, tandis que sa forme particulière cytosolique est active¹³². En revanche, dans les cellules épithéliales, la iNOS montre une localisation différente ; elle se situe au niveau apical de ces cellules polarisées, liée au cytosquelette d'actine cortical. Le NO produit par cette iNOS intervient dans la polarisation des cellules épithéliales¹³³.

De manière plus générale, il a été démontré que plusieurs isoformes de la NOS se localisent dans la mitochondrie dans certains tissus. La eNOS possède une localisation mitochondriale dans les fibres musculaires squelettiques du diaphragme¹³⁴, dans le cerveau non-synaptosomal¹³⁵, ainsi que dans le cœur, les muscles squelettiques et le rein¹³⁶. La eNOS se trouve plus précisément sur la membrane externe de la mitochondrie, au niveau cytosolique¹³⁷. La nNOS semble plutôt être localisée au niveau de la membrane mitochondriale interne, dans les fibres du muscle squelettique latéral vaste¹⁰⁶. De même, il a été montré que la iNOS se situe au niveau de la membrane mitochondriale interne, du côté de la matrice¹³⁸. Cette iNOS est exprimée de manière constitutive dans la mitochondrie et est aussi appelée NOS mitochondriale (mtNOS). Le NO produit par cet isoforme régule la consommation d'oxygène et le potentiel transmembranaire des mitochondries par une réaction réversible avec le cytochrome c¹³⁸⁻¹⁴⁰.

D- Régulation de la NOS

1- Régulations cellulaires

Calmoduline

La CaM est la première protéine interagissant avec la NOS à avoir été mise en évidence. C'est aussi le premier point de régulation de l'activité de la NOS puisqu'elle est nécessaire à son activité.

Régulations pré- et post-traductionnelles

Les trois isoformes de la NOS sont régulées aux niveaux post-transcriptionnel et post-traductionnel. La régulation de la production de la iNOS se fait majoritairement à l'étape transcriptionnelle. La iNOS étant majoritairement sous forme inductible, son expression est

corrélée à la quantité d'ARNm de iNOS. Des études sur le promoteur murin de iNOS ont mis en évidence deux régions régulatrices¹⁴¹ : l'une est sensible aux lipopolysaccharides et l'autre aux cytokines pro-inflammatoires. Toutefois, la iNOS peut aussi être régulée au niveau post-transcriptionnel.

La transcription de la eNOS est régulée par différents facteurs, tels que NF- κ B, le facteur de transcription LKLF (lung Küpper-like factor) et FOXO-1^{142,143}. Contrairement à la iNOS, l'expression de la eNOS est très régulée post-traduction, notamment par un rétro-contrôle du NO. En effet, une production importante de NO cause une nitrosylation de la eNOS, ce qui induit sa monomérisation et son inactivation¹⁴⁴. De plus, la eNOS est sujette à plusieurs phosphorylations qui influencent son activité. Plusieurs études ont montré que la Ser₁₁₇₇ de la eNOS peut être phosphorylée par la voie de la protéine kinase Akt^{145,146}. Cette phosphorylation induit une augmentation du flux d'électron dans le domaine réductase et une augmentation de la production de NO. Des résultats similaires sont observés suite à la phosphorylation de la SER₆₃₃ de la eNOS¹⁴⁷. En revanche, une phosphorylation de la Thr₄₉₅, située au niveau du site de fixation de la CaM, inhibe l'activité de la eNOS¹⁴⁸. La nNOS aussi peut subir une phosphorylation. Des études ont montré que la Ser₈₄₇ de la nNOS peut être phosphorylée par des kinases dépendantes à la CaM, ce qui inhibe l'activité de la nNOS¹⁴⁹.

Inhibition par interaction protéine-protéine

La *NOS interaction protein* (NOSIP) est une protéine nucléaire qui se transloque dans le cytoplasme à la phase G2 du cycle cellulaire. La NOSIP interagit avec les nNOS et eNOS, induit leur translocation vers le cytosquelette d'actine et inhibe leur activité^{150,151}. De plus, comme expliqué précédemment, la eNOS située au niveau des cavéoles est inhibée par la fixation de la protéine Caveolin-1. La dissociation de eNOS de la Caveolin-1 constitue une étape précoce de son activation.

2- Inhibiteurs de la NOS

De nombreux inhibiteurs de la NOS ont déjà été décrits. Ils sont classés par leur site de fixation et leur mécanisme d'action. La cible principale de ces inhibiteurs est le domaine oxygénase de la NOS.

a) Domaine oxygénase

Inhibiteurs de BH₄

Il existe deux types principaux d'inhibiteurs de BH₄. La première classe correspond aux agents ciblant le site de fixation de BH₄ sur la NOS ; la seconde classe correspond aux composés inhibant la synthèse de BH₄. Le mécanisme d'action des inhibiteurs de la première classe semble compliqué à réaliser. En effet, les inhibiteurs synthétisés présentent une faible affinité pour BH₄ et une forte toxicité¹⁵², ou une absence d'inhibition de la NOS à un niveau basal¹⁵³. L'utilisation de la seconde classe d'inhibiteurs présente de nombreux inconvénients puisque BH₄ est le co-facteur de plusieurs autres enzymes, comme la tyrosine hydrolase et tryptophane hydrolase. Ainsi, l'inhibition de la protéine BH₄ peut causer des effets secondaires indésirables tels qu'une diminution de la biosynthèse de la dopamine, l'épinephrine, la norepinephrine et la sérotonine^{154,155}.

Inhibiteurs de L-arginine

La majorité des inhibiteurs de la NOS au niveau du domaine de fixation de la L-arginine sont des analogues de la L-arginine¹⁵⁶. Tous les isoformes peuvent être inhibés par ces analogues, comme c'est le cas avec l'ester *N*^o-nitro-L-arginine methyl (L-NAME) ou le *N*^o-nitro-L-arginine (L-NNA). D'autres inhibiteurs présentent une spécificité de l'isoforme, tels que l'acide ([S]-2-amino-[1-iminoethylamino]-5-thio-heptanoïque (GW274150) qui inhibe spécifiquement la iNOS¹⁵⁷. Les mécanismes d'inhibition de l'activité de la NOS par ces inhibiteurs varient, mais ils impliquent tous une occupation compétitive du site de fixation de la L-arginine et donc une inhibition de la production de NO.

Ce type d'inhibiteur a été largement utilisé pendant les années 1990 et a montré des effets dans différentes formes de chocs, d'inflammations et dans les troubles du système nerveux central. Cependant, en plus de leur manque de spécificité d'isoforme, ils causent de nombreux effets secondaires, comme l'hypercholestérolémie ou des insuffisances rénales^{158,159}.

Inhibiteurs de l'hème

Certains dérivés de l'imidazole anti-fongique ont été décrits comme inhibant l'activité de la NOS en interagissant avec l'hème dans site actif du domaine oxygénase. Ils inhibent aussi l'activité de la NOS par compétition avec la CaM¹⁶⁰.

b) Interface des deux domaines

Inhibiteurs de la CaM

Les isoformes eNOS et nNOS peuvent être inhibés par des inhibiteurs de la CaM, tel que le calmidazolium. Pour des raisons liées à l'affinité, la iNOS n'est pas sensible à ces agents.

c) Domaine réductase

Inhibiteurs des flavines

FAD et FMN sont des co-facteurs de la NOS et, par analogie avec leur fonction dans l'enzyme réductase P450, sont impliqués dans le transfert d'électron du NADPH au centre catalytique. L'inhibiteur des flavoprotéines, diphenyleneiodonium, inhibe de manière irréversible l'activité de la NOS en se fixant au site de liaison du FAD¹⁶¹.

Nanoshutter

La première famille de molécules inhibant la NOS en ciblant le site de liaison du NADPH est appelée Nanoshutter^{162,163} (NS). La structure du NS est basée sur l'assemblage de deux parties essentielles¹⁶⁴ : la partie de fixation à la NOS (partie nucléotidique) et la partie chromophorique. La partie de reconnaissance de la NOS permet une fixation spécifique et efficace du NS au site de fixation du NADPH sur la NOS (encadré vert, Figure I-15). Des données cristallographiques de protéines fixant le NADPH ont montré que les principaux motifs d'identification du NADPH dans son site de liaison sont situés sur sa partie nucléotidique. En effet, des résidus arginine très conservés de la NOS interagissent avec le sucre, les cycles de l'adénine et le phosphate du NADPH par de nombreuses liaisons hydrogène. La conception du NS conserve la structure globale et la longueur de la partie nucléotidique du NADPH, afin de conférer une fixation correcte du NS au site de liaison du NADPH sur la NOS. La partie chromophorique du NS remplace la partie nicotinamide du NADPH (encadré bleu, Figure I-15). A l'extrémité de cette partie chromophorique, est greffé un groupement accepteur d'électron (NO₂) permettant l'inhibition du transfert d'électron à travers la NOS.

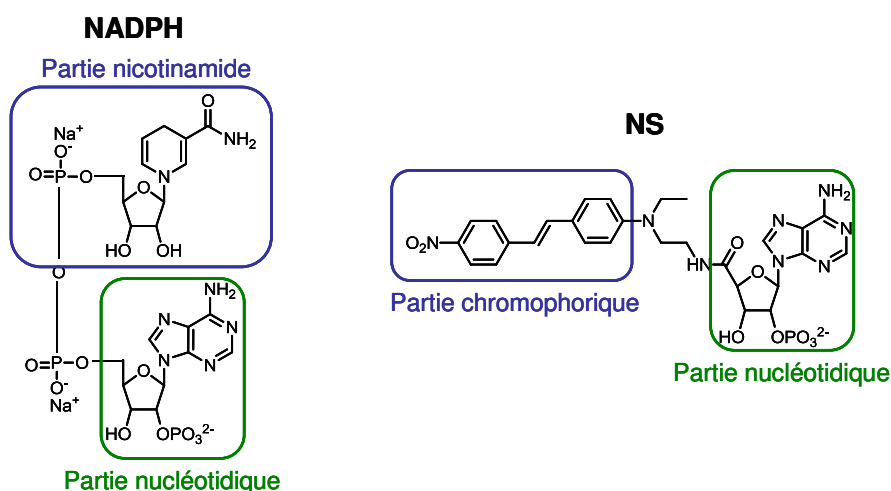


Figure I-15. Structures du NADPH et de NS. La partie nucléotidique du NADPH est conservée (encadré vert) et la partie nicotinamide du NADPH est remplacée par une partie chromophorique (encadré bleu) sur NS.

Des études menées sur NS1, la première molécule de type NS synthétisée, ont montré une fixation de celle-ci à la NOS avec une très bonne affinité, similaire à la fixation du NADPH sur la NOS. La fixation de NS1 au niveau du site de liaison du NADPH permet d'inhiber l'initiation du transfert d'électron, donc d'éviter les fuites d'électron *via* la NOS, contrairement aux inhibiteurs ciblant les autres domaines de la NOS. De plus, le groupement NO_2 et la partie chromophorique de NS1 permettent une bonne absorption 1- et 2-photon ainsi qu'une fluorescence de forte intensité lorsque la molécule est fixée à la NOS^{162,163}.

3 - Photocontrôle

Depuis quelques années, des études sur le contrôle de la production de NO ont permis de mettre en place une nouvelle stratégie basée sur des molécules fluorescentes, appelées Nanotrigger^{165,166}.

Comme expliqué précédemment, les électrons sont donnés par le NADPH au domaine réductase de la NOS ; puis du domaine réductase au domaine oxygénase où le NO est produit. Le but de la synthèse de Nanotrigger (NT) est la conception d'une molécule pouvant se fixer au site de liaison du NADPH sur la NOS et générer un transfert d'électron uniquement sous excitation lumineuse à une longueur d'onde appropriée. La fixation du NT à la NOS ne peut pas générer de potentiel redox assez élevé pour déclencher le transfert d'électron, seule

l'excitation lumineuse peut le faire. Un tel composé permettrait de générer « à la demande » le transfert d'électron primaire de la NOS *in situ*.

Au niveau de la structure, NT et NS partagent la même partie nucléotidique qui permet leur fixation au domaine réductase de la NOS (encadré vert, Figure I-16). La principale différence entre NT et NS réside dans la partie chromophorique, où un groupe accepteur d'électron (NO_2) est remplacé par un groupe donneur d'électron (NH_2) (cercle rouge, Figure I-16). De plus, la longueur de la partie chromophorique est différente pour NT et NS (encadré rose, Figure I-16) : NT possède un fragment diène alors que NS possède un stilbène. La conception de la partie chromophorique de NT est basée sur un système quadripôle de type Q_n , qui a un potentiel de réduction très élevé à l'état excité. Le nombre n détermine la longueur totale de NT. Quand n augmente, le maximum d'absorption se déplace vers de plus grandes longueurs d'onde et la section efficace d'absorption 2-photon augmente pour des longueurs d'onde dans le proche infrarouge¹⁶⁷. De plus, la partie chromophorique est riche en doubles liaisons et liée à la partie nucléotidique par une liaison peptidique. Cette structure permet de « bloquer » la NOS dans une conformation active, favorable au transfert d'électron. Elle permet aussi de maximiser la délocalisation des électrons π dans le chromophore et d'optimiser les propriétés d'absorption 1- et 2-photon. Des modélisations moléculaires ont permis d'ajuster la longueur totale du chromophore pour une optimisation de la fixation du NT dans le site de liaison du NADPH de la nNOS^{165,168}. Ainsi, sous excitation lumineuse, la partie chromophorique de NT sera fortement oxydée et transférera un électron à la NOS, par le FAD.

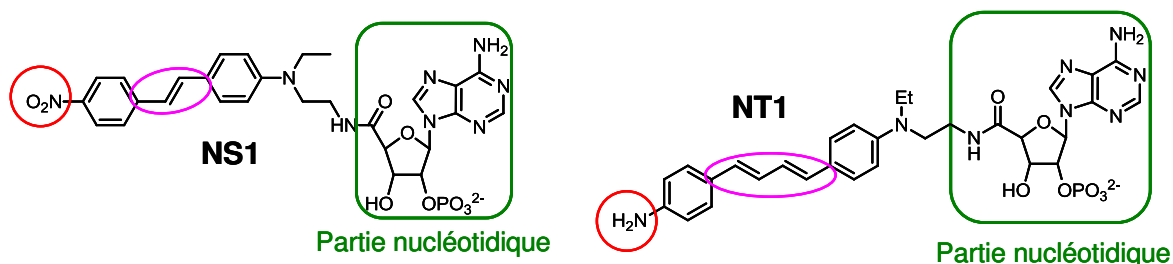


Figure I-16. Structures de NS1 et NT1. NS1 et NT1 possèdent la même partie nucléotidique (encadré vert), mais leur partie chromophorique diffère sur leur longueur (encadré rose) et le groupement électronique à l'extrémité (cercle rouge).

Le concept de NT a été validé par la synthèse d'une première génération : NT1. La partie chromophorique de NT1 est constituée d'un quadripôle Q_2 . Sur la partie chromophorique, en plus de son pouvoir réducteur, le NH_2 terminal est destiné à améliorer la solubilité de NT dans l'eau et de renforcer son affinité pour le site de liaison du NADPH sur la NOS¹⁶⁴. Des études

de NT1 ont montré une fixation compétitive de cette molécule et du NADPH sur le site de fixation sur la NOS, ainsi qu'une augmentation de la production de NO *in vitro* sous excitation lumineuse^{166,169}. De plus, NT1 présente une bonne absorption 2-photon, ce qui favorise l'utilisation de longueurs d'onde plus pénétrantes pour des expériences *in situ*.

III- Objectifs

Les travaux réalisés au cours de cette thèse concernent deux familles de molécules fluorescentes : les triphénylamines (TPAs) et les Nanotrigger de deuxième génération (NT). Ces molécules ont été conçues pour photo-déclencher des processus biologiques sous excitation 1- et 2-photon. Ces deux familles de molécules ciblent des constituants cellulaires différents, induisant ainsi des processus cellulaires différents. Les TPAs pénètrent dans les cellules et se localisent dans différents organites cellulaires. Sous excitation lumineuse, ils induisent une mort cellulaire médiée par une production de ROS. Les NT de deuxième génération ont été conçus pour se fixer à la protéine NOS et d'initier un flux d'électron sous excitation photonique, conduisant à une production de NO.

A- Etude des TPAs pour la thérapie photodynamique

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont été principalement portés sur l'étude de molécules montrant un grand intérêt pour la PDT 2-photon : les triphénylamines (TPAs). En effet, cette famille de molécule a initialement été synthétisée pour marquer le noyau, par fixation à l'ADN. Cette famille est également caractérisée par une bonne section efficace d'absorption 2-photon (250-1080 GM)^{170,171}. Les TPAs sont des molécules cationiques possédant un cœur triphénylamine sur lequel sont greffés deux ou trois liens vinyliques, au bout desquels est conjugué un groupement accepteur d'électrons (Figure I-17).

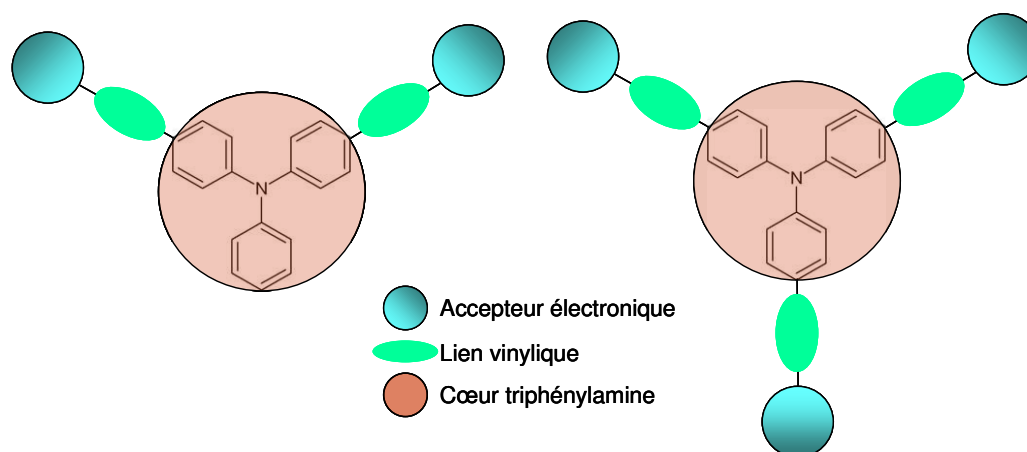


Figure I-17. Structure générale des Triphénylamines.

Ces molécules ont été initialement synthétisées pour avoir une bonne absorption 2-photon, due à leur organisation octupolaire. Elles présentent une grande stabilité chimique et photophysique, ainsi qu'une bonne solubilité dans l'eau. Les TPAs ont précédemment montré une bonne affinité pour l'ADN ($K_a \approx 10^{-6}$ - 10^{-7} M^{-1}) se fixant au sillon mineur de la double hélice d'ADN, avec un rendement quantique de fluorescence élevé lorsqu'elles sont fixées. Ces caractéristiques en font, par conséquent, de très bons marqueurs du noyau dans les cellules fixées, avec une forte brillance sous excitation 1- et 2-photon. Cependant, leur comportement est radicalement différent dans les cellules vivantes. En effet, les expériences décrites ci-dessous révèlent une localisation initiale cytoplasmique dans les cellules vivantes. Sous excitation lumineuse, elles se délocalisent rapidement du cytoplasme pour aller dans le noyau. De manière concomitante à cette relocalisation, on observe un bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules, témoignant de la mort cellulaire.

Parmi les différentes molécules synthétisées par l'équipe du Dr Marie-Paule Teulade-Fichou (Institut Curie-Orsay, UMR 176), nous nous sommes intéressés à six d'entre elles (Figure I-18). Les six TPAs étudiées ont été choisies en fonction de leur nombre de branches et du type de leur groupement accepteur d'électron. Ce dernier peut être un groupement pyridinium (Py), ortho-pyridine (Pyo) ou N-méthyl benzimidazolium (Bzim). Ces molécules sont nommées selon la nature du cœur (triphénylamine, TP), le nombre de branches (2 ou 3) et le groupement accepteur (Py, Pyo ou Bzim). Ainsi, la triphénylamine substituée par deux accepteurs pyridinium portés par un lien vinylique sera appelée TP2Py et celle portant trois accepteurs pyridinium TP3Py ; de même pour les molécules portant des groupements N-méthyl benzimidazolium (TP2Bzim et TP3Bzim) et ortho-pyridine (TP2Pyo et TP3Pyo).

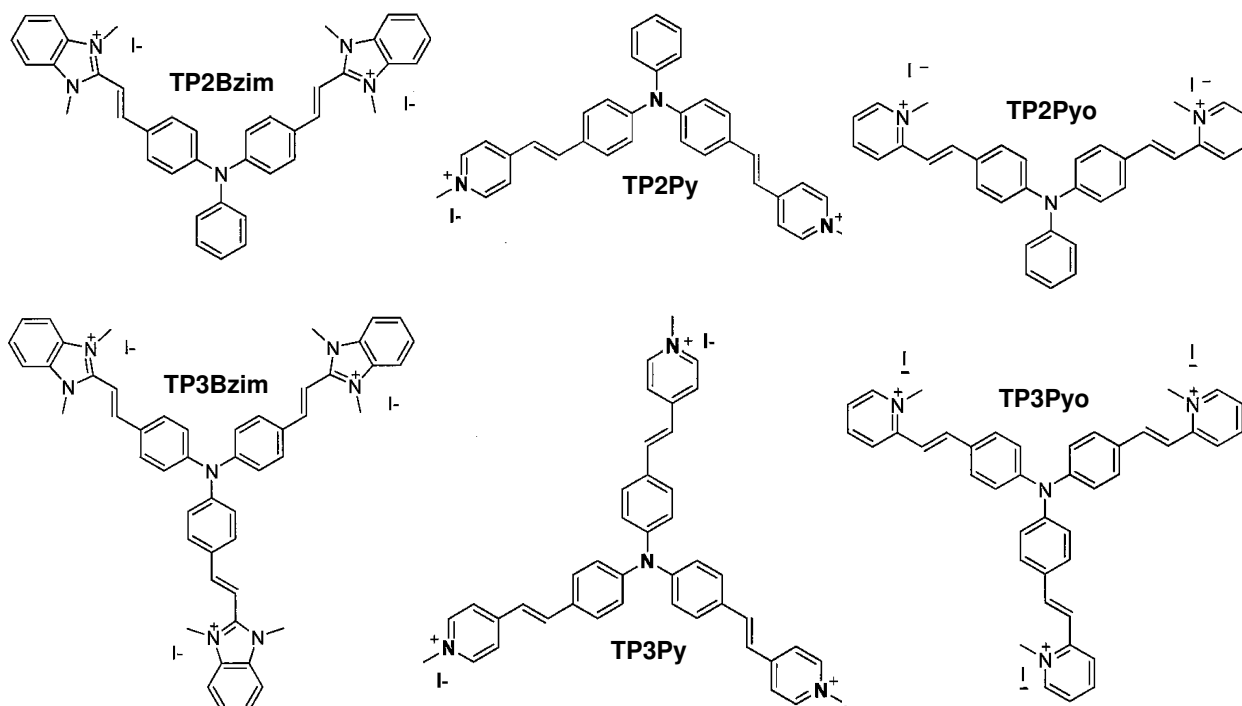


Figure I-18. Structure des six triphénylamine étudiées.

Les phénomènes de relocalisation et de mort cellulaire photo-induits ont été initialement observés avec TP2Py. Afin de déterminer si ces observations sont propres à TP2Py ou si elles sont généralisables aux TPAs, nous nous sommes d'abord intéressés à deux molécules différant sur le nombre de branches et le type de groupement accepteur d'électron : TP2Py et TP3Bzim. A partir de ces deux molécules, nous avons pu déterminer le mécanisme mis en œuvre par leur photo-activation 1- et 2-photon, ainsi que le type de mort cellulaire. De manière générale, les observations sont les mêmes pour ces TP2Py et TP3Bzim. Au cours de mon travail, il s'est avéré que ces molécules différaient concernant une caractéristique, leur localisation cellulaire initiale. En effet, TP3Bzim présente une localisation partielle dans les endosomes tardifs et dans les mitochondries, alors que TP2Py a une localisation exclusivement mitochondriale. Dans un second temps, nous avons élargi le nombre de molécules étudiées afin de vérifier si les phénomènes observés sous excitation 1- et 2-photon sont photo-induits par toutes ces molécules. Nous avons aussi déterminé les relations entre la structure, la localisation cellulaire et les mécanismes induits par les TPAs, ainsi que différencier les phénomènes dus au nombre de liens vinyliques ou à la nature de l'accepteur électronique portés par les TPAs.

B- Etude de NT de deuxième génération

Une partie des travaux de cette thèse reposent sur l'étude de nouvelles molécules de type NT, dites NT de deuxième génération. La structure et la synthèse des NT de deuxième génération diffèrent de celles de NT1 sur plusieurs points. De manière générale, ces modifications ont pour but de simplifier la synthèse chimique et d'améliorer le rendement afin d'accéder à une variété de structures. Cette nouvelle stratégie de synthèse repose principalement sur la chimie « click ». Cette technique de synthèse chimique permet d'assembler rapidement et de manière fiable des petites molécules synthétisées au préalable^{172,173}.

Les parties chromophoriques et nucléotidiques des NT de deuxième génération présentent quelques différences avec celles de NT1. Sur le ribose de la partie nucléotidique (encadré vert, Figure I-19), le groupement phosphate a été remplacé par un groupement carboxylate dont la synthèse est plus simple et les interactions avec la NOS sont similaires. Sur les NT de deuxième génération, la position de ce groupement carboxylate a été variée en 2' du ribose, en 3' ou sur les deux positions. Sur la partie chromophorique (encadré bleu, Figure I-19), un groupement méthyle a été greffé sur le NH₂ terminal, afin de déterminer son influence sur la stabilité et les propriétés photophysiques de la molécule.

Les parties chromophoriques et nucléotidiques des NT de deuxième génération ont été assemblées par chimie « click », à partir des différentes parties synthétisées séparément, pour conduire à la formation d'un cycle triazole¹⁷⁴. Cette technique modulable permet donc de produire une vaste gamme de molécules différentes¹⁷⁵. Par cette technique, la liaison peptidique reliant les parties chromophorique et nucléotidique est remplacée par le groupement triazole sur les NT de deuxième génération (cercle jaune, Figure I-19). Ce groupement triazole est connu pour mimer la liaison peptidique grâce à leur similarité de taille, de planéité, de capacité aux liaisons hydrogène et de moment dipolaire. De plus, cet isostère présente un avantage en biologie : il est plus résistant aux dégradations par les protéases¹⁷⁶.

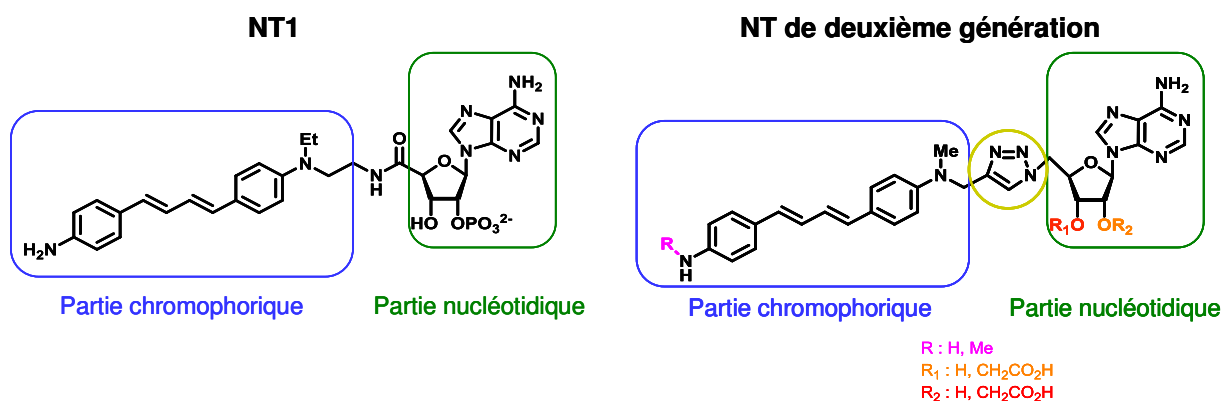


Figure I-19. Structures générales de NT1 et des NT de deuxième génération.

La nouvelle stratégie de synthèse des NT a permis de produire sept molécules de deuxième génération : NT2, NT3, NT4, NT5, NT6, NT7 et NT9 (Figure I-20). Ces molécules ont la même structure de base : une partie chromophorique et une partie nucléotidique reliées par un cycle triazole. Elles sont classées selon leurs différences de structure.

Leur structure diffère par le nombre et la position du groupement carboxyle sur le ribose de la partie nucléotidique : NT2 et NT3 possèdent deux groupement carboxylate, NT4 et NT5 possèdent un groupement carboxylate en 3', NT6 et NT7 possèdent un groupement carboxylate en 2' et NT9 ne possède pas de groupement carboxylate. La nature du groupe ,donneur d'électron sur la partie chromophorique est aussi différente selon les molécules ; les NT ayant un chiffre pair possèdent un groupement NH-méthyle (NH-Me), tandis que les NT ayant un chiffre impair conservent le NH_2 .

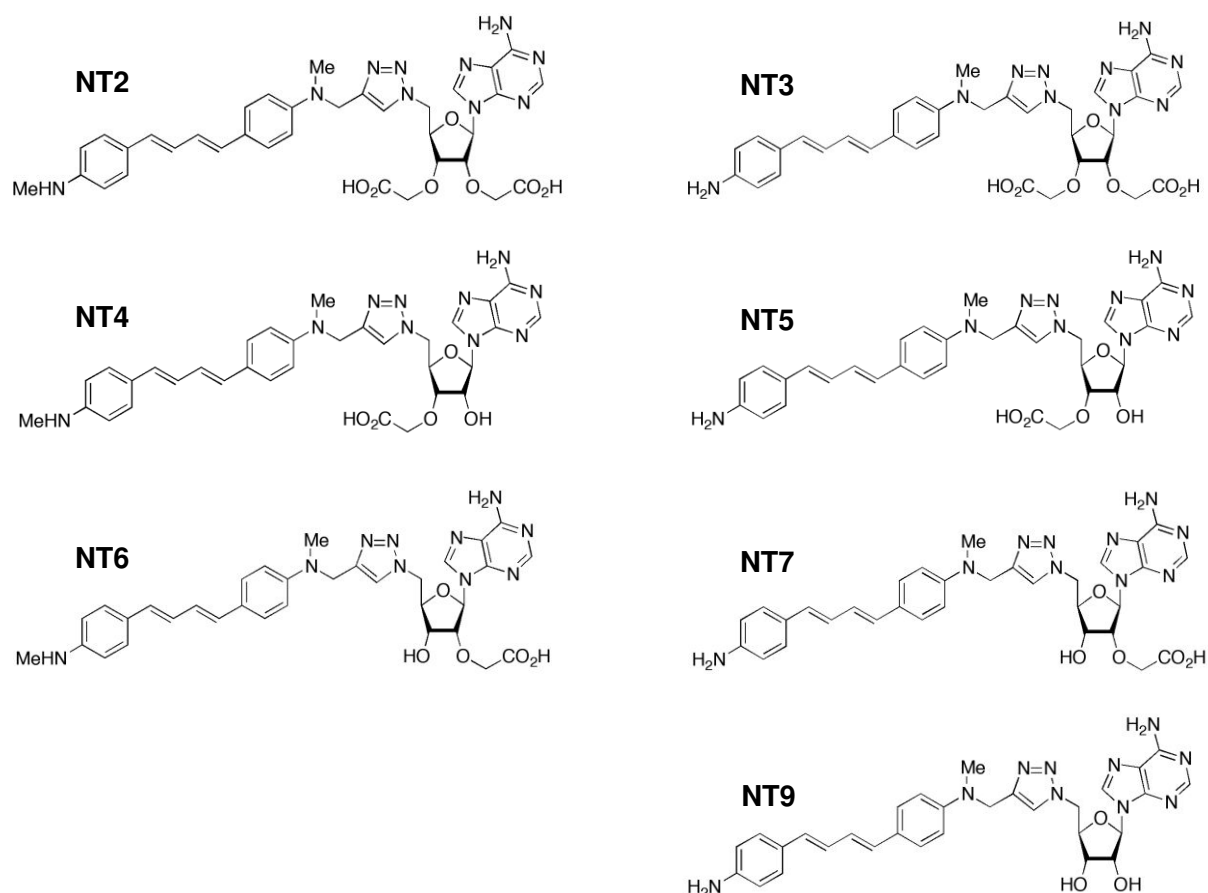


Figure I-20. Structure des NT de deuxième génération.

L'intérêt principal d'avoir une gamme aussi variée de NT de deuxième génération est de pouvoir étudier la structure afin d'optimiser la stabilité des molécules, leur fluorescence, ainsi que leur capacité à se fixer à la NOS et à transférer des électrons. La structure de la partie chromophorique des NT de deuxième génération a été conceptualisée pour présenter de bonnes caractéristiques spectrophysiques, notamment concernant la fluorescence et l'absorption 2-photon. La fluorescence et la stabilité des molécules ont été étudiées par des méthodes spectroscopiques dans différents solvants : le tampon Tris permet de mimer au mieux le milieu cellulaire et le DMSO, de plus grande viscosité, permet d'appréhender le comportement des molécules lorsqu'elles ont une conformation plus plane, ce qui renseigne sur leurs probables caractéristiques dans la NOS.

Les principales expériences menées avec les NT de deuxième génération ont été réalisées *in vitro* sur des cellules endothéliales (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells) exprimant la eNOS. Dans un premier temps, nous avons déterminé la capacité des différents NT à pénétrer et fluorescer dans les cellules, en rapport avec leurs caractéristiques mesurées *in vitro*. Ensuite, nous nous sommes intéressés à leur localisation cellulaire ; plus

particulièrement, à un organelle exprimant la eNOS, l'appareil de Golgi. Les variations apportées sur la structure de la partie nucléotidique des NT de deuxième génération devraient influencer la fixation de ces molécules sur la NOS. Nous devrions alors observer des différences de localisation cellulaire des différents NT.

Nous avons aussi appréhendé la capacité de production de NO par transfert d'électrons à travers la NOS. Enfin, pour chacune de ces expériences, nous avons établi une hiérarchie des différents NT de deuxième génération afin d'identifier la structure la plus appropriée pour photo-déclencher la production de NO.

CHAPITRE II

PRINCIPES EXPERIMENTAUX

Ce chapitre traite les concepts généraux des différentes techniques utilisées lors de cette thèse. Les détails expérimentaux sont précisés dans le chapitre « Résultats ». Le lecteur est invité à consulter les sections « Matériel et Méthode » pour de plus amples informations d'ordre méthodologique et technique.

A- Microscopie de fluorescence

La fluorescence est devenue une technique incontournable en imagerie cellulaire par microscopie. La microscopie de fluorescence des avantages intéressants par rapport à la microscopie optique classique, mais elle nécessite un marquage préalable des échantillons par des colorants fluorescents. Cette technique a permis de grandes avancées biomédicales. Récemment, elle a été utilisée pour l'imagerie de tissus biologiques ou du petit animal et pour guider des opérations chirurgicales. Son utilisation plus classique permet d'obtenir des informations importantes sur la localisation subcellulaire, le traçage et les interactions de molécules, ou encore le sondage de composés chimiques.

Il existe trois techniques de microscopie de fluorescence qui diffèrent par l'instrumentation : la microscopie d'épifluorescence (dite à champ large), la microscopie confocale et la microscopie biphotonique. Les mêmes montages expérimentaux peuvent permettre la mise en œuvre de techniques dérivées, comme les mesures des temps de vie de fluorescence (FLIM).

1- Microscopie d'épifluorescence

La microscopie d'épifluorescence utilise comme source lumineuse une lampe, le plus souvent au mercure, à laquelle un filtre est ajouté pour sélectionner la longueur d'onde d'excitation. Le montage est basé sur l'utilisation d'un miroir dichroïque qui permet d'envoyer la lumière incidente sur l'échantillon et de ne laisser passer dans l'autre sens que la fluorescence émise (Figure II-1.a). L'échantillon est alors éclairé sur une large surface, et le signal émis est également filtré avant d'être envoyé vers un détecteur (caméra CCD, par exemple). Cette technique permet de visualiser les vraies couleurs émises par l'échantillon.

La microscopie d'épifluorescence permet une observation standard de la fluorescence par une résolution en deux dimensions selon xy, ce qui donne une image présentant une superposition de la fluorescence émise par tous les plans de l'échantillon (Figure II-1.b).

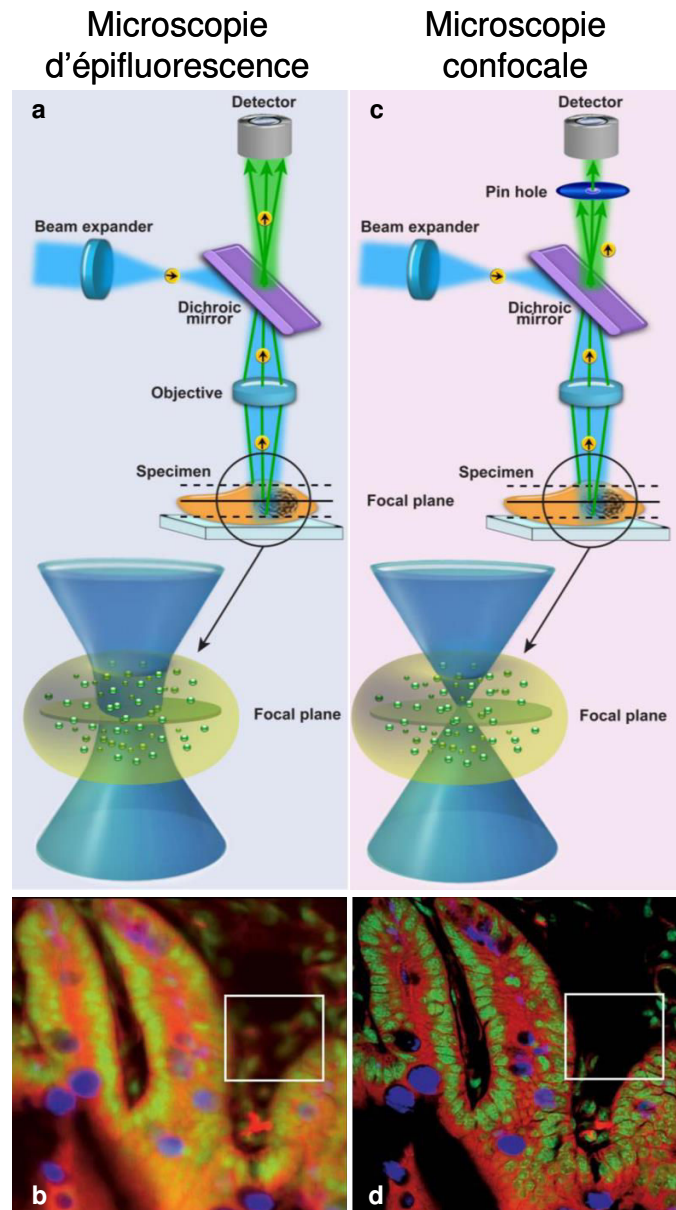


Figure II-1. Microscopie d'épifluorescence et microscopie confocale. La microscopie d'épifluorescence induit un champ d'excitation de l'échantillon plus large (a) et récolte la fluorescence émise par tous les plans de l'échantillon (b). La microscopie confocale permet de limiter l'excitation et l'émission de l'échantillon à un plan focal grâce au pinhole (c), ce qui donne une image de fluorescence de meilleure résolution (d).

2- Microscopie confocale

La microscopie confocale a été mise au point pour pallier les problèmes de résolution rencontrés en épifluorescence. Le microscope confocal utilise une source laser focalisée sur un point et balayant l'échantillon point par point afin de reconstituer son image, d'où le nom de *Laser Scanning Confocal Microscopy* (LSCM). Un dispositif optique supplémentaire est installé avant le détecteur : le *pinhole* (Figure II-1.c). Celui-ci a pour but de sélectionner l'émission de photons provenant d'un seul plan de l'échantillon observé, ce qui permet de pratiquer des coupes virtuelles de l'échantillon. La microscopie confocale ajoute donc une résolution en z (Figure II-1.d). Des coupes successives de l'échantillon permettent une reconstitution d'images en trois dimensions. Plus le *pinhole* est fermé, moins la lumière parasite est récoltée, mais l'intensité du signal sera aussi plus faible. Les détecteurs en microscopie confocale sont des tubes photomultiplicateurs (PMT) qui compte les photons récoltés et amplifie le signal. Le détecteur ne distingue pas les longueurs d'onde, il retransmet une image en différents niveaux de gris. Les couleurs de l'image sont des fausses couleurs attribuées par l'utilisateur.

3- Microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique a été mise au point par Webb en 1990. Le dispositif est similaire au confocal et peut être réalisé sur les mêmes montages. La principale différence est la source d'excitation : la microscopie biphotonique utilise un laser infrarouge pulsé (Figure II-2). Comme nous l'avons vu précédemment, le volume d'excitation en 2-photon est très faible, l'utilisation d'un *pinhole* n'est donc plus nécessaire. Même sans ce dispositif confocal, la microscopie biphotonique permet d'avoir une meilleure résolution en z (principe autofocal). Le sectionnement optique a lieu alors au niveau de l'excitation, alors qu'il a lieu à l'émission dans le cas de la microscopie confocale.

La microscopie biphotonique présente un grand avantage pour l'imagerie tissulaire. En effet, l'excitation 1-photon dans l'ultraviolet (UV) ou le visible présente une mauvaise pénétration. Ceci est dû d'une part à la diffusion de la lumière à ces longueurs d'ondes ; et d'autre part à l'absorption de fluorophores cellulaires ou tissulaires intrinsèques, comme le collagène, l'élastine, les flavines ou le NADPH. De plus, les longueurs d'onde se situant dans

l'infrarouge sont fortement absorbées par les molécules d'eau (à partir de 1000 nm). Cependant, il existe une fenêtre de transparence entre 700 et 950 nm, où l'absorption des tissus biologiques est minimisée. Une excitation dans cette fenêtre optique a permis de faire évoluer la microscopie biphotonique vers une imagerie intravitale (*in situ*).

La microscopie biphotonique présente un autre avantage : les longueurs d'onde utilisées en infrarouge sont de plus faible énergie donc moins nocifs, alors que l'UV est connue pour causer d'importants dommages, notamment sur l'ADN.

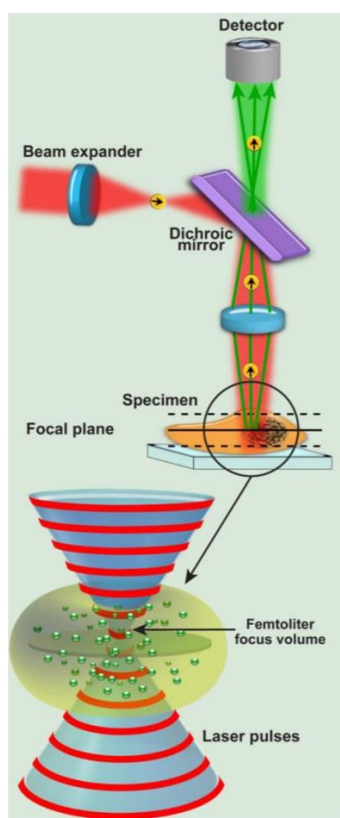


Figure II-2. Microscopie multiphotonique. Le microscope multiphotonique utilise une source laser pulsée qui permet de confiner l'excitation de l'échantillon à un point focal.

Lors de ce travail de thèse, les trois types de microscopie ont été utilisés. Toutes les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal SP2 (Leica MicroSystem) équipé d'une chambre d'incubation (37°C, 5% CO₂) et d'une lampe. En épifluorescence, une lampe à vapeur de Mercure est utilisée pour l'excitation.

En ce qui concerne les expériences menées sur les triphénylaminés, les filtres d'excitation et d'émission utilisés pour l'épifluorescence laissent passer la lumière entre 450-490 nm et 515-700 nm, respectivement. Pour le mode confocal, un laser continu (458 nm) a été utilisé

pour l'excitation et un dispositif (prisme + fente) a été utilisé pour sélectionner la lumière émise (470-550 nm et 560-720 nm, pour les TP-Bzim et TP-Py/TP-Pyo, respectivement).

Les images de fluorescence 2-photon ont été obtenues avec un dispositif similaire que pour les images en 1-photon, à l'exception de la source d'excitation qui est un laser accordable en mode verrouillé à 80 MHz Ti:Sapphire Mai Tai[®] (720-920 nm, laser pulsé 100 fs ; Spectra Physics, Mountain View, CA, USA). Les TPAs ont été excitées à différentes longueurs d'onde en 2-photon (entre 760 nm et 860 nm) et leur fluorescence a été recueillie à 470-550 nm pour les TP-Bzim et 560-720 nm pour les TP-Py et TP-Pyo. La longueur d'onde d'excitation 2-photon est la même pour tous les NT (760 nm), de même que les fentes utilisées à l'émission (450-550 nm).

4- Co-localisation

La microscopie de fluorescence est l'un des outils les plus puissants pour élucider les fonctions cellulaires de diverses molécules. Dans de nombreux cas, la fonction d'une molécule dépend de son association avec des compartiments intracellulaires spécifiques ou des complexes moléculaires. La localisation intracellulaire des molécules d'intérêt est déterminée en comparant la distribution cellulaire d'une version de ces molécules marquée par fluorescence à celle d'une autre sonde fluorescente, marquant spécifiquement un compartiment ou une molécule cellulaire. Les molécules fluorescentes utilisées pour une co-localisation doivent avoir des caractéristiques spectrales différentes ; elles doivent se distinguer par leur longueur d'onde d'excitation et/ou leur longueur d'onde d'émission. Ainsi, en microscopie de fluorescence, deux molécules sont co-localisées lorsque leurs signaux sont confondus par le système de détection.

Les expériences de co-localisation ont été réalisées, en partie, à l'aide de marqueurs spécifiques de certains organites cellulaires : MitoTracker (mitochondrie), LysoTracker (lysosome) et BODIPY (appareil de Golgi) (Molecular Probes, Invitrogen). La localisation subcellulaire des NT a été étudiée en présence d'un marqueur spécifique de l'appareil de Golgi émettant dans le rouge (BODIPY TR-ceramide ; excitation à 543 nm, émission à 635-700 nm).

Les TPAs émettant dans le vert (TP2Bzim et TP3Bzim) ont été étudiées en présence de marqueurs cellulaires émettant dans le rouge : MitoTracker Red FM (excitation à 633 nm,

émission à 650-700 nm) et LysoTracker Red DND-99 (excitation à 543 nm, émission à 600-700 nm). Inversement, les TPAs émettant dans le rouge (TP2Py, TP3Py, TP2Pyo et TP3Pyo) ont été étudiées avec des marqueurs cellulaires émettant dans le vert : MitoTracker Green FM, LysoTracker Green DND-26 (excitation à 488 nm, émission à 500-550 nm). Pour les TPAs, les co-localisations avec des marqueurs chimiques du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et des endosomes tardifs ont présenté des difficultés de réalisation dues aux caractéristiques spectrales de ces marqueurs ou à leurs conditions d'utilisation (anticorps spécifiques). Ces organites cellulaires ont été visualisés par fluorescence à l'aide d'un plasmide exprimant une protéine recombinante contenant la protéine fluorescente Cerulean (émission dans le bleu) et des peptides d'adressage et de conservation dans ces organites. Les détails des constructions de ces plasmides sont précisés dans les sections « Matériel et Méthode » du chapitre « Résultats ». La protéine Cerulean a été excitée à 458 nm et l'émission a été récoltée à 465-510 nm.

B- Mesures spectrophysiques

Les molécules TPA ont été synthétisées par l'équipe du Dr Marie-Paule Teulade-Fichou à l'institut Curie-Orsay (UMR 176). Les molécules NT ont été synthétisées par les collaborateurs chimistes de l'équipe du Pr Joanne Xie (PPSM, UMR 8531, ENS Cachan). Les caractéristiques d'absorption dans l'UV-visible ont été obtenues à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon XL (Bioserv). Pour les expériences en 1-photon, les spectres d'émission ont été mesurés par un spectrofluorimètre Eclipse (Varian) à l'aide de cuves à quartz de 80 μ l (Hellma[®], Paris, France). Les fentes d'émission utilisées pour les spectres sont de 5 nm. Les spectres en 2-photon ont été obtenus à l'aide d'un montage mis en place au laboratoire. Ce dernier utilise un laser accordable en mode verrouillé à 80 MHz Ti:Sapphire Mai Tai[®] (690-1040 nm, laser pulsé 100 fs ; Spectra Physics, Mountain View, CA, USA) focalisé sur l'échantillon placé dans une cuve à quartz de 80 μ l. L'émission émise par l'échantillon a été collectée à 90° et filtrée par un filtre Semrock FF01-842/SP. Le signal filtré est récupéré par un spectrographe (300 lines/mm) couplé à un détecteur CCD refroidi à l'azote liquide (1024x256 pixels ; Princeton Instruments Acton, MA, USA). Pour l'excitation, le laser a été utilisé à une puissance de 50 mW et le temps d'acquisition variait de 10 à 30 s.

Les rendements quantiques de fluorescence des NT ont été déterminés en prenant la coumarine 1 comme référence. Les sections efficaces d'absorption 2-photon des TPA et des NT ont été déterminées en utilisant comme référence la rhodamine B et la fluorescéine, respectivement.

C- Cytométrie en flux

La cytométrie en flux présente un grand intérêt dans le domaine biomédical en général, surtout en immunologie et biologie cellulaire. Elle permet l'analyse multiparamétrique à l'échelle particulaire (virus, bactérie ou cellule eucaryote), de manière individuelle. En effet, elle permet de caractériser, de quantifier et de trier les cellules à partir de groupes de populations hétérogènes, tout en conservant la viabilité cellulaire.

1- Principe

Le fonctionnement d'un cytomètre en flux est basé sur trois parties.

Un **système fluidique** permet le passage des échantillons dans le dispositif. L'échantillon à analyser est injecté au moyen d'une seringue de précision à travers un capillaire à l'intérieur d'un liquide vecteur : le liquide de gaine (Figure III-3). Les cellules en suspension sont accélérées vers la cellule de flux où elles sont centrées par focalisation hydrodynamique grâce au liquide de gaine ; formant alors un flux monodisperse où les cellules circulent les unes à la suite des autres. Ce flux monodisperse est ensuite conduit à la chambre de mesure (canal de comptage en quartz).

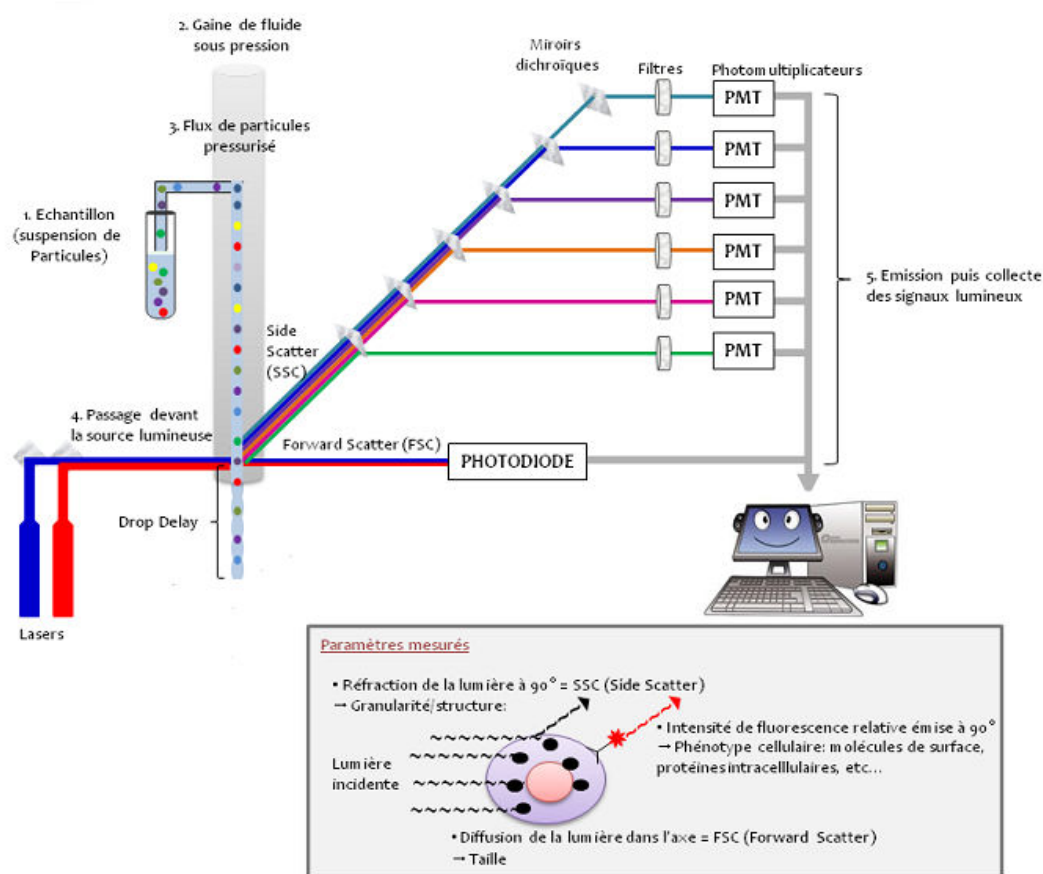


Figure III-3. Principe de la cytométrie en flux.

La chambre de mesure est constituée d'un **système optique**. Au niveau de cette chambre en quartz, les cellules passent à travers un faisceau laser bleu à 488 nm (laser Argon) (Figure III-3). Sous l'effet de cette excitation, les cellules vont diffuser les photons du laser. Les signaux de diffusion sont acheminés jusqu'à des détecteurs de type photodiode. Le signal de diffusion collecté aux petits angles ($< 15^\circ$) par rapport à la direction d'incidence du faisceau laser renseigne sur la taille de la cellule analysée. Le signal de diffusion collecté à 90° est en relation avec la forme et la structure interne de la cellule (granularité, organelles...). L'utilisation de ce laser apporte un autre avantage, il peut exciter des fluorophores dans la cellule. Certains cytomètres en flux possèdent d'autres lasers, par exemple à 405 nm ou 633 nm, permettant d'exciter un plus grand nombre de fluorophores. La fluorescence émise par les fluorophores intracellulaires est recueillie à 90° grâce à un ensemble de miroirs dichroïques, de filtres et de tubes photomultiplicateurs.

Les signaux électriques sont convertis en valeurs digitales par un **système électronique**. Cette conversion se fait en temps réel sur un ordinateur relié au cytomètre (Figure III-3).

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé la cytométrie en flux pour deux types d'expériences concernant les TPAs : la détection de ROS et la différenciation de la mort cellulaire.

2- Détection de ROS

Le 2',7'-dichlorohydrofluorescein diacétate (H₂DCFDA) est une forme chimiquement réduite de la fluorescéine qui n'est pas fluorescente. C'est un détecteur de ROS couramment utilisé. Cette molécule est capable de traverser la membrane plasmique jusque dans le cytoplasme où elle est desacétylée en DCFH par les estérases cellulaires. En cas de production de ROS, ceux-ci oxydent le DCFH en DCF, qui est une molécule fluorescente émettant dans le vert.

Les expériences de détection de ROS ont été réalisées à l'aide du cytomètre en flux FACSCalibur (Becton-Dickinson, Sunnydale, CA, USA). Les cellules ont été excitées grâce à un laser à 488 nm. Les fluorescences ont été recueillies par des détecteurs FL1 et FL2 équipés de filtres d'émission FITC (détection de l'émission dans le vert, 530/30 nm) et PE (détection de l'émission dans l'orange-rouge, 585/42 nm), respectivement. Les résultats ont été analysés avec le logiciel CellQuestTM Pro.

3- Différenciation de la mort cellulaire

L'annexine V est une protéine cellulaire d'environ 35,5 kDa. Elle est capable de se lier aux membranes cellulaires de manière réversible et dépendante au Ca²⁺. Plus précisément, en présence de concentrations élevées de Ca²⁺, l'annexine V possède une forte affinité pour les phosphatidylsérines présentes dans la membrane plasmique. Cette affinité est similaire à celle d'un anticorps pour son antigène. Des méthodes de purification et de couplage de l'annexine V avec des fluorophores ont permis de mettre au point une technique de marquage et de détection de la mort cellulaire. En effet, comme décrit précédemment, un des phénomènes précoces de l'apoptose est l'externalisation des phosphatidylsérines passant du feuillet interne de la membrane plasmique des cellules saines au feuillet externe de la membrane plasmiques de cellules apoptotiques. Ainsi, seules les phosphatidylsérines des cellules apoptotiques sont accessibles au marquage de l'annexine V couplée au fluorophore. Néanmoins, lors de la

nécrose, la membrane plasmique subit d'importants dommages provoquant une perméabilisation de celle-ci. L'annexine V marquée peut alors pénétrer dans les cellules et se fixer aux phosphatidylsérines présentes dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Le test annexine V renseigne sur la mort cellulaire, mais seul ne suffit donc pas à différencier les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques. Les tests de différenciation de la mort cellulaire utilisent le marquage par l'annexine V couplé au marquage par des molécules pénétrant uniquement dans les cellules perméabilisées. Ces molécules vont pouvoir pénétrer dans les cellules nécrotiques dont la membrane plasmique est perforée, mais pas dans les cellules apoptotiques. A des stades tardifs de l'apoptose, la membrane plasmique se détériore et peut laisser passer ces molécules non perméantes. Les molécules classiquement utilisées sont des agents intercalant de l'ADN : l'iodure de propidium et la 7-aminoactinomycine D (7-AAD). Pour des raisons d'incompatibilité des longueurs d'onde, ces molécules n'ont pas pu être utilisées pour les expériences de mort cellulaire avec les TPAs ; nous avons utilisé le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), une autre molécule non perméante s'intercalant dans l'ADN.

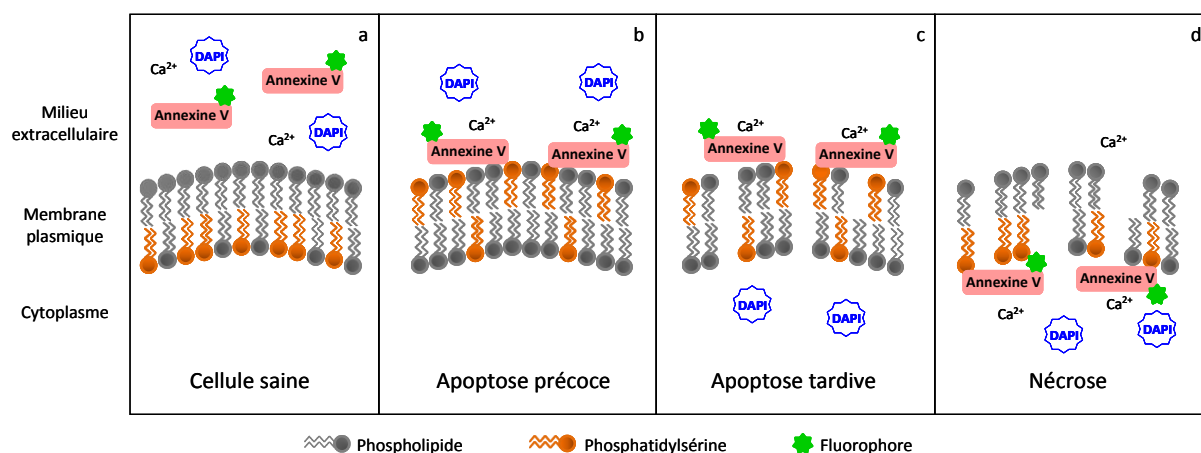


Figure III-4. Différenciation de la mort cellulaire par double marquage Annexine V/DAPI.

Les expériences de marquage annexine V/DAPI ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux FACSCanto II (Becton-Dickinson, Sunnydale, CA, USA), à l'institut Cochin (INSERM-U1016, CNRS-UMR 8104 et Université Paris Descartes - UMR-S1016). Les TPAs ont été excitées à 488 nm. Celles qui fluorescent dans le vert ont été détectées grâce à un filtre FITC à 530/30 nm ; alors que les TPAs qui fluorescent dans l'orange-rouge ont été détectées à l'aide d'un filtre PE à 585/42 nm. L'annexine V-FITC a été excitée à 488 nm et détectée à l'aide du filtre FITC à 530/30 nm ; et l'annexine V-Cy5 a été excitée à 633 nm et détectée

grâce au filtre APC à 660/20 nm. Le DAPI a été excité à 405 nm et la fluorescence émise a été recueillie par un filtre Pacific BlueTM à 450/50 nm.

D- Mesures biochimiques

La Poly(ADP-ribose) polymérase est une famille de protéines nucléaires dont la fonction principale est de détecter et signaler l'ADN monocaténaire aux systèmes enzymatiques chargés de restaurer l'ADN bicaténaire. Comme précisé précédemment, PARP-1 participe à la réparation de l'ADN par une réaction de catalyse du NAD⁺. Lors de dommages importants sur l'ADN, causés par des réactions métaboliques, chimiques ou radioactives, PARP-1 est suractivée et consomme de grandes quantités de NAD⁺. La diminution de la concentration cellulaire de NAD⁺ déclenche un signal pro-nécrotique. En revanche, lors de l'apoptose, PARP-1 est une cible des caspases effectrices. Lorsque ces dernières sont activées, elles clivent PARP-1 en deux fragments de 89 kDa et de 24 kDa spécifiques à l'apoptose.

Lors de cette thèse, l'une des méthodes permettant de mettre en évidence la mort cellulaire par apoptose induite par la photo-activation des TPAs a été la détection du clivage de PARP-1. Les cellules HeLa ont été traitées par les TPAs et illuminées à différents temps. Elles ont ensuite été lysées afin de récupérer le contenu cellulaire. Le clivage de PARP-1 a été détecté par Western blot à l'aide d'un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-PARP-1 (#9542, Cell Signaling Technology). Cet anticorps reconnaît spécifiquement la forme entière et le fragment de 89 kDa de PARP-1.

CHAPITRE III

RESULTATS

I- Comportement différentiel de dérivés cationiques triphénylamine dans des cellules fixées et vivantes : déclencher et imager la mort cellulaire

Ce premier article traite de la découverte des phénomènes photo-induits par les TPAs sur les cellules vivantes. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux molécules de la famille des TPAs, différant par leur nombre de liens vinyliques (TP2 ou TP3) et aussi par la nature de leur groupement accepteur d'électron (pyridinium ou N-méthyl benzimidazolium) : TP2Py et TP3Bzim. Les expériences réalisées sur des cellules fixées confirment le marquage du noyau par la fixation de TP2Py et TP3Bzim sur l'ADN. Cependant, sur les cellules vivantes, les TPAs présentent une localisation cellulaire initiale cytoplasmique, avec les deux molécules qui co-localisent avec les mitochondries. Sous excitation lumineuse continue (dans la partie visible du spectre), les molécules se délocalisent vers le noyau et induisent, de manière concomitante, une mort cellulaire morphologiquement caractérisée par l'apparition de bourgeonnements membranaires. Ces phénomènes de relocalisation des TPAs et de bourgeonnement membranaire ont été observés sur cinq lignées cellulaires cancéreuses. Nous avons confirmé la photo-induction de la mort cellulaire par ces molécules à l'aide de tests de viabilité cellulaire. De plus, ces expériences de photocytotoxicité, couplées à des expériences en imagerie, ont permis de souligner l'importance de la combinaison des TPAs et de l'excitation photonique pour l'induction de la mort cellulaire. Ces expériences ont également montré un effet dose-réponse de l'induction de la mort cellulaire par l'excitation lumineuse des TPAs en variant la concentration de molécules et la dose de lumière administrées. La photocytotoxicité des TPAs et l'imagerie simultanée du processus apoptotique nécessitent des concentrations bas-micromolaire ou submicromolaire ; des concentrations bas-nanomolaires (jusqu'à 20 nM) induisent la mort cellulaire, toutefois, l'enregistrement simultanée du processus d'apoptose par imagerie de fluorescence n'est pas possible. De plus, des expériences sur des cellules traitées par les TPAs et un autre agent pro-apoptotique (camptothécine) ont montré un marquage initial nucléaire des cellules en apoptose. Ainsi, la localisation subcellulaire initiale des TPAs permet de renseigner sur l'état de la cellule et de savoir si la cellule marquée a entamé ou non un processus apoptotique. D'autre part, nous avons défini le type de mort cellulaire photo-induit par ces molécules par des tests biochimiques, en mettant en évidence le clivage de la Poly(ADP)ribose polymérase 1 (PARP-1) en un fragment de 89 kDa formé de manière spécifique lors de l'apoptose. Nous avons

également démontré, par imagerie directe et par cytométrie en flux, que l'apoptose est induite par une formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) résultant de la photo-activation des TPAs. En conclusion, les TPAs présentent un grand intérêt pour la PDT 1-photon, mais aussi pour le marquage de la mort cellulaire grâce à leur forte fluorescence.

Differential Behaviour of Cationic Triphenylamine Derivatives in Fixed and Living Cells

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

R. Chennoufi,^{a,#} H. Bougherara,^{a,#} N. Gagey-Eilstein,^{a,c} B. Dumat,^b E. Henry,^{a,c} F. Subra,^a S. Bury-Moné,^a F. Mahuteau-Betzer,^b P. Tauc,^a M-P. Teulade-Fichou^{*b} and E. Deprez^{*a}

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/chemcomm

Triphenylamines are on/off fluorescent DNA minor groove binders, allowing nuclear staining of fixed cells. By contrast, they accumulate in the cytoplasm of living cells and efficiently trigger cell apoptosis upon prolonged visible light irradiation. This process occurs concomitantly with their subcellular re-localization to the nucleus, enabling fluorescence imaging of apoptosis.

Cell death, including apoptosis or programmed cell death, plays a determinant role in the regulation of physiological homeostasis.^{1,2} Dysregulation of apoptosis (negative or positive) can lead to several disorders such as cancer, neurodegenerative, autoimmune or ischaemic diseases.^{3,4} Such a dysregulation can be counteracted by therapeutic strategies aiming at modulating the apoptotic response. For example, this is the case in the cancer field of radiation therapy, chemotherapy or photodynamic therapy (PDT) which increase apoptosis. The development of pro-apoptotic compounds and apoptosis imaging probes is of high interest for therapy and diagnosis as well as for monitoring cell death at the cellular level for fundamental purposes.^{5,6} Here, we report that triphenylamines (TPAs) belong to another compound family. They combine apoptosis-inducing and imaging properties. They are pro-apoptotic compounds upon photoexcitation with a clear cytoplasm-nucleus translocation of the fluorescence signal which coincides with cell death (consistently observed in 5 different human cancer cell lines).

TPA compounds bear two or three vinyl branches terminated with pyridinium (Py)⁷ or N-methyl benzimidazolium (Bzim)⁸ groups, exemplified in the present study by **TP2Py** and **TP3Bzim**, respectively (Fig. 1a). They are primarily DNA minor groove binders ($K_a = 10^6$ – 10^7 M⁻¹) characterized by a fluorescence quantum yield

that is strongly modulated upon DNA-binding. Maximum excitation and emission wavelengths of TPAs are in the 435–510 and 555–685 nm ranges, respectively, depending on the compound and the environment.^{7–9} These properties are expected to be compatible with a specific nuclear staining with high contrast. Indeed, when MCF7 (breast cancer) or HeLa (cervical cancer) cells were fixed (in paraformaldehyde or ethanol) and treated with **TP2Py** or **TP3Bzim**, epifluorescence or confocal imaging clearly showed a nuclear localization of TPAs with bright staining (Fig. S1, ESI[†]), in accordance with results obtained using fixed MRC5 cells.^{8,9}

Remarkably, the distribution of the fluorescence signal of TPAs in living cells was completely different. The observation of TPA-treated living cells revealed a cytoplasmic localization of TPAs in the short time scale (in the very first minutes of observation in the case of epifluorescence microscopy; see below), with no detectable nuclear staining. Furthermore, the localization of TPAs was dramatically modified upon observation. A decrease in the cytoplasmic fluorescence intensity was observed, concomitant with a strong increase in the nuclear fluorescence intensity. Transmission images showed a concomitant formation of membrane blebs, a morphological hallmark of apoptosis following externalization of phosphatidylserine at the plasma membrane level.^{1,10,11}

The subcellular localization of TPAs in living MCF7 cells, at early times of observation, was exclusively cytoplasmic as shown in confocal imaging (Fig. 1b). The observation/excitation at 458 nm (irradiance, 30 mW/cm²) triggered a rapid re-localization of the fluorescence signal from the cytoplasm to the nucleus. The TPA re-localization process began at $t = 5$ –15 min after excitation; the formation of membrane blebs was detected in the transmission mode in the time range of 60–80 min (fluence, 108–144 J/cm²) accompanied by dramatic morphological changes (nucleus and cell shrinkages), strongly suggesting that cells undergo apoptosis (see also Movies S1a–c, ESI[†]). Under light illumination, the observed decrease in the fluorescence emission intensities of **TP2Py** or **TP3Bzim** in cytoplasm (starting after a lag period of 5–15 min) was found to be anti-correlated with a net increase in fluorescence intensities in the nucleus (Fig. 1c). To note, with respect to the increasing signal at the nucleus level, the corresponding curve was biphasic, regardless of the compound; the first maximum (reached

^a Laboratory of Biology and Applied Pharmacology, ENS Cachan, CNRS UMR8113, IDA FR3242, F-94235 Cachan, France

^b Laboratory of Chemistry, CNRS UMR176, Institut Curie, University of Orsay, Paris-Sud, 91405 Orsay, France

^c Present addresses: N.G.-E.: CNRS UMR8638, University of Paris-Descartes, 75006 Paris; E.H.: UMR6197 CNRS / UBO / IFREMER, 29280 Plouzane, France

These authors contributed equally to this work

* Corresponding authors: deprez@lbpa.ens-cachan.fr; mp.teulade-fichou@curie.fr

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: Experimental details, complementary imaging and photocytotoxicity experiments (fixed cells, other cell lines, epifluorescence microscopy, concentration-dependence study and spectral analysis in the cell context). See DOI: 10.1039/x0xx00000x

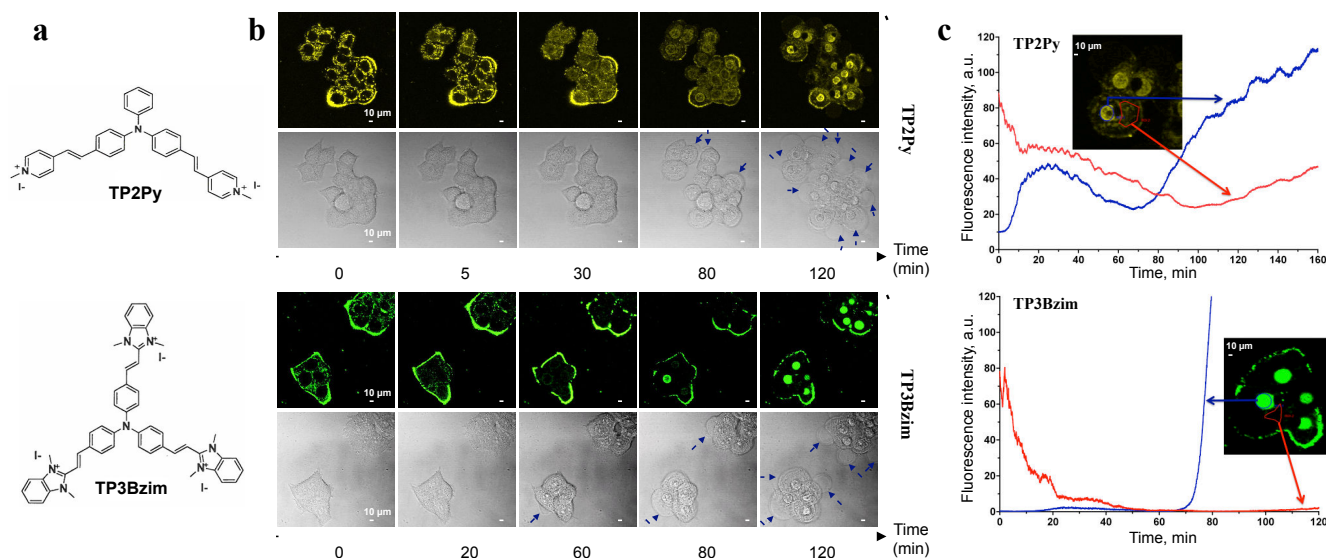


Fig. 1 Confocal fluorescence imaging of living MCF7 cells treated with TPAs. (a) Chemical structures of **TP2Py** and **TP3Bzim**. (b) Time-dependent re-localization of the fluorescence signal of **TP2Py** (top) or **TP3Bzim** (bottom) from the cytoplasm to the nucleus after light excitation ($\lambda_{exc} = 458$ nm; irradiance, 30 mW/cm^2 ; emission slit settings: 560–720 nm and 530–690 nm for **TP2Py** and **TP3Bzim**, respectively). Corresponding DIC (differential interference contrast) transmission images illustrating the concomitant membrane blebbing (blue arrows) are shown below fluorescence images. Living MCF7 cells were pre-incubated with $2 \mu\text{M}$ TPA for 2 h at 37°C before observation. (b) Quantification of the fluorescence emission intensity of **TP2Py** (top) or **TP3Bzim** (bottom) as a function of time (after illumination) in selected ROIs (regions of interest) corresponding to the nucleus (blue) or the cytoplasm (red) as explicitly shown.

at $t = 20\text{--}25$ min, corresponding to a fluence of $\approx 40 \text{ J/cm}^2$) was reproducibly followed by a significant decrease in the intensity signal, before the observation of a second increasing phase (starting after 70–80 min). These two phases correspond to two successive steps leading to fluorescence emission, most likely the transport across the nuclear membrane and the DNA-binding step *per se*, respectively. The resulting fluorescence enhancement was higher with **TP3Bzim** than with **TP2Py**, consistent with the fluorescence quantum yields measured for the two DNA-bound dyes in vitro ($\Phi_f = 0.34$ and 0.07 , respectively^{8,9}). The general features of TPAs (photo-induced nuclear translocation, membrane blebbing) were similar in four other human cancer cell lines: HeLa, LNCaP (prostate adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular liver carcinoma) and non-adherent Jurkat cells (T-lymphoid leukemia) (Fig. S2, ESI†). Moreover, when examined using epifluorescence microscopy (irradiance, 1.8 W/cm^2), the overall process was qualitatively similar compared to confocal experiments with, however, some discrepancies in the time course of event appearance due to the excitation and irradiance conditions that are different between epifluorescence and confocal experiments (Fig. S3, ESI†).

A different behavior was observed with a neutral TPA, **TP3^NBzim**. Living MCF7 cells treated with **TP3^NBzim** displayed a non-specific staining pattern with a clear nuclear staining at $t=0$ (Fig. S4, ESI†), similar to that observed with cationic TPAs in fixed cells. Moreover, no membrane blebbing or morphological change of cells was further observed under light illumination. This result suggests that (i) the cationic charge of **TP2Py/TP3Bzim** ensures a cytoplasmic localization, thereby preventing nuclear localization in the absence of light illumination, and (ii) nuclear localization/DNA-binding is not directly responsible for cell death occurring on a short time scale.

We next established the relationship between light irradiance, TPA concentration and the fate of TPAs in the cellular context. First, the nuclear translocation of TPAs and cell death as observed in microscopy experiments were shown to be dependent on the use of an external source of illumination only, based on the following observations: (i) The initial observation consistently showed a cytoplasmic localization of TPAs, regardless of the pre-incubation (cells + TPA) time, 2 or 16 h, preceding excitation/observation (Fig. S5, ESI†). (ii) Each time the illumination field was changed for a given coverslip, the overall process (nuclear translocation and membrane blebbing) restarted, regardless of the time period separating the end of incubation and the observation (Fig. 2). Thus, only cells in the irradiated area underwent apoptosis.

Altogether, these results show that TPAs in the dark or exposed to daylight were not efficient to trigger nuclear translocation and cell death, and that an external/ artificial source of excitation was strictly required for the observation of the overall apoptotic process (confirmed thereafter by photocytotoxicity studies). We next addressed the question of whether nuclear translocation of TPAs could be related to a cell death process not directly triggered by TPA irradiation. Interestingly, when HeLa cells were treated with TPA and the pro-apoptotic camptothecin compound,¹² the initial microscopic observation (at $t=0$) highlighted a nuclear location of **TP3Bzim** or **TP2Py** (Fig. S6, ESI†), instead of a cytoplasmic location, suggesting that initial nuclear location of either TPA accounts for apoptosis and that TPAs can be used to image apoptosis caused by another factor, exogenous in the case of camptothecin.

The influence of irradiance was further studied for a given TPA concentration. **TP2Py** ($2 \mu\text{M}$) was pre-incubated with living MCF7 cells and then observed using confocal microscopy with varying illu-

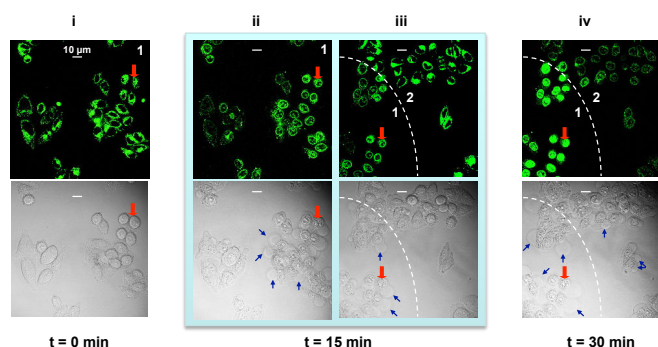


Fig. 2 Light illumination is responsible for nuclear translocation of TPAs and concomitant membrane blebbing. HeLa cells pre-treated with 2 μM **TP3Bzim** were excited under the epifluorescence mode (excitation filter, 450–490 nm; irradiance, 1.8 W/cm^2) and images were recorded using the confocal mode. From left to right: (i) Initial observation ($t=0$) showing the cytoplasmic localization of **TP3Bzim**. (ii) Observation at $t=15$ min: ongoing nuclear translocation of **TP3Bzim** and blebs appearance can be observed in fluorescence and transmission modes, respectively. (iii) Right after this observation, the excitation area was changed by moving the sample (the cell indicated by the red arrow serves as a landmark): **TP3Bzim** was exclusively cytoplasmic in the newly excited area 2. (iv) Observation at $t=30$ min: the cells in area 2 (subjected to 15 min-illumination) were characterized by a cytoplasm \rightarrow nucleus re-localization of **TP3Bzim** in a comparable manner to that observed in panel (ii) whereas the cells in area 1 (subjected to 30 min-illumination) displayed a more intense fluorescence signal in the nucleus.

mination powers of the laser source. The time course of the nuclear translocation of **TP2Py** (measured by the fluorescence intensity at the nucleus level) was then compared for two irradiance values (Fig. S7a, ESI[†]). The first fluorescence maximum (as shown in Fig. 1c) was observed at $t_{\text{max}} = 18$ min for an irradiance of 30 mW/cm^2 (in accordance with results shown in Fig. 1c) and was time-shifted for a lower irradiance ($t_{\text{max}} = 90$ min at 5.6 mW/cm^2). Using integration times based on t_{max} values, the deduced fluence values were found to be consistent, 32.4 and 30.2 J/cm^2 , respectively. Next, living MCF7 cells were treated with varying concentrations of **TP2Py** (2 μM , 0.2 μM and 0.02 μM , respectively) for a given irradiance (30 mW/cm^2). A clear dose response effect on the time course of nuclear translocation was observed. Indeed, at 0.2 μM **TP2Py**, the lag period and the t_{max} value were 85 and ≈ 170 min, respectively (compared to 5 and 18–25 min, respectively, at 2 μM) (Fig. S7b, ESI[†]). The delay in the appearance of membrane blebs paralleled the delay in the re-localization event. The fluence values deduced from t_{max} were 32.4 and 306 J/cm^2 for concentrations of 2 and 0.2 μM **TP2Py**, respectively. It is important to note that, even under conditions where the **TP2Py** concentration (20 nM) was too low to enable fluorescence detection, blebs were consistently observed under the transmission mode, however membrane blebbing was delayed (≈ 200 min) (Fig. S7c, ESI[†]).

The effect of TPAs on cell viability was tested on two cell lines, HeLa (Fig. 3) and MCF7 (Fig. S8, ESI[†]). The photocytotoxicity using an artificial source of illumination at 452 nm was compared to the dark toxicity (cells were protected from any light source) and the toxicity induced by daylight. In HeLa cells, LT_{50} values (time of light exposure lethal for 50% of the cells) were 30 and 15 min for **TP2Py**

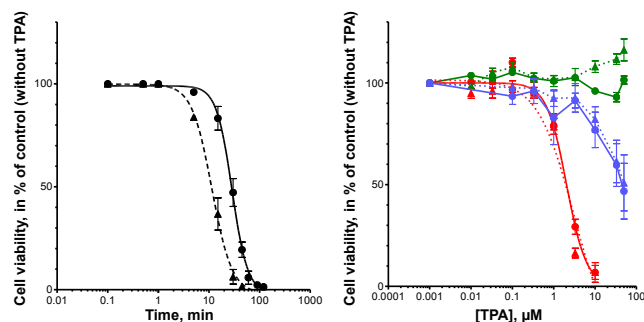


Fig. 3 Photocytotoxicity of TPAs in HeLa cells. Cell viability (in % of untreated cells) as a function of illumination time (for a given TPA concentration) (left) or as a function of TPA concentration (for a given illumination time) (right). Left: HeLa cells were treated with 2 μM **TP2Py** (black circles) or **TP3Bzim** (black triangles) for 2 h at 37°C and further illuminated at 452 nm for varying times. Right: HeLa cells were treated with varying concentrations of TPA (circles: **TP2Py**; triangles: **TP3Bzim**) and subjected to light illumination at 452 nm during a time period corresponding to LT_{50} (red curves) as determined in the left panel, subjected to daylight illumination for 30 min (blue curves) or protected from light (green curves). The source of excitation was a Mercury lamp (130 W, wavelength 380–600 nm) coupled to a filter ($\lambda = 452 \pm 45 \text{ nm}$); irradiance, 17 mW/cm^2 .

and **TP3Bzim**, respectively (corresponding to light dose values of 30.6 and 15.3 J/cm^2 , respectively) indicating that **TP3Bzim** was slightly more toxic than **TP2Py** under this illumination condition ($\text{LT}_{50} = 40$ and 15 min for **TP3Bzim** and **TP2Py** in MCF7 cells, corresponding to light dose values of 40.8 and 15.3 J/cm^2 , respectively). The cells were then treated with varying concentrations of TPA and subjected to light illumination during a time period corresponding to LT_{50} . For HeLa cells, the dark toxicity was negligible up to 50 μM TPA. Moreover, at the TC_{50} value (2 μM ; concentration of TPA leading to 50% lethality under light illumination at 452 nm), no toxicity was detected with daylight exposure. However, a slight daylight toxicity was observed with TC_{50} values around 50 μM for both TPAs. Accordingly, we observed both membrane blebbing and nuclear translocation of TPAs after 2-hour incubation of 30–50 μM TPA with HeLa cells exposed to daylight (data not shown). General characteristics were similar using MCF7 cells; however, although moderate, the dark toxicity of **TP3Bzim/TP2Py** was higher in MCF7 than in HeLa cells ($\text{TC}_{50} = 60$ –65 μM). Taken together, these results confirm that TPAs induce light-dependent cell death in the low micromolar range, in agreement with imaging experiments; dark or daylight toxicities are negligible or moderate below 30 μM .

The $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ compound (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) which is converted into the highly fluorescent form DCF in the presence of reactive oxygen species (ROS)¹³ was next used in fluorescence microscopy imaging to evaluate the participation of ROS in TPA-mediated apoptosis upon photoactivation. Excitation of living cells pre-treated with **TP2Py** ($\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$) led to a specific fluorescence enhancement of DCF in the irradiated area and ROS production in selected areas was consistently correlated with **TP2Py** nuclear translocation (Fig. 4). Together, these results indicate that the combination of **TP2Py** and light exposure accounts for a burst of

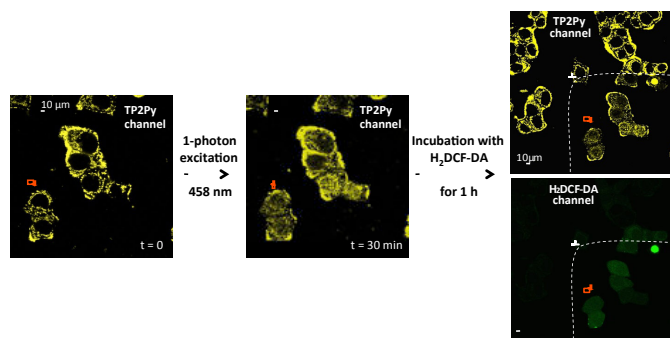


Fig. 4 Fluorescence imaging of ROS production upon photoactivation of **TP2Py**. Living MCF7 cells were pre-incubated with 2 μM **TP2Py** for 2 h in the dark at 37°C and further exposed to visible light irradiation for 30 min ($\lambda_{\text{exc}} = 458$ nm; irradiance, 30 mW/cm^2). Confocal fluorescence imaging of **TP2Py** before (left) or after (middle) 30-min illumination. The cells were then treated with 10 μM $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ for 1 h. After this additional incubation step, the excitation area for imaging was changed by moving the sample and then was enlarged (the cell indicated by the red arrow serves as a landmark). Right: Confocal fluorescence imaging of **TP2Py** (top; $\lambda_{\text{exc}} = 458$ nm) or DCF (bottom; $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm). Emission slits were 560–720 and 500–530 nm for **TP2Py** and DCF, respectively. Only cells initially subjected to the 30-min period of light illumination (this area is delineated by a dashed line in the right panel) displayed both a fluorescence signal of DCF accounting for ROS production and fluorescence emission of **TP2Py** in the nucleus.

intracellular concentration of ROS that mediates cell apoptosis.

In summary, TPAs are efficient apoptosis-inducers at a low micromolar to submicromolar range (e.g. 200 nM), which is compatible with simultaneous fluorescence imaging of apoptosis. TPAs are also active at ten-fold lower concentrations (e.g. 20 nM), however, in this case, their intra-cellular tracking by fluorescence imaging is not possible and the apoptotic effect is then monitored by observation of membrane blebbing using transmission imaging.

In the dark or exposed to daylight, two- or three-branch TPAs remain localized in the cytoplasm and do not further affect cell morphology. Although further studies are needed to determine more accurately their initial location, the emission spectra of TPAs in the cellular context suggest that, at least **TP3Bzim** is not a freely-diffusing compound in the cytoplasm but most likely is sequestered in organelles (Fig. S9, ESI†). The cationic nature of TPAs appears to prevent their direct localization to the nucleus of living cells since a neutral derivative directly localized in the nucleus and was unable to initiate apoptosis upon light illumination. The importance of the positive charge for the cytoplasmic location, the further light-induced re-localization process associated with ROS production, suggest a mitochondrial metabolism dysfunction.¹⁴ The initial nuclear location of TPAs in camptothecin-treated cells reinforced an existing relationship between their subcellular fate and mitochondrial integrity.¹² The estimated fluences were found to be between 15 and 144 J/cm^2 (values obtained with 2 μM TPA), depending mainly on the excitation source and what is observed. Most of the conventional PDT compounds – porphyrin, chlorine and their respective derivatives – are characterized by lower fluence values (generally below 10 J/cm^2 , max. 15 J/cm^2 under 1-photon

excitation^{15–17}). The fluence values of TPAs highlight a higher stringency in terms of light dose response, in accordance with the well-separated photocytotoxicity and daylight/dark toxicity. If necessary, irradiance can be decreased and TPA concentration can be adjusted, up to 30 μM since daylight/dark toxicities remain negligible in this concentration range.

In conclusion, TPAs induce rapid and efficient cell apoptosis upon visible light irradiation and this effect is accompanied by their re-localization from the cytoplasm to the nucleus that can be easily monitored by fluorescence imaging. TPAs display good profiles as apoptosis inducer and tracer, at least in the cell context. For further applications at the tissue or organism levels, although TPAs are characterized by one-photon absorption bands which fall outside the so-called therapeutic window,¹⁸ they have good two-photon absorption cross-sections.⁸ The effects of near infra-red excitation of TPAs are currently under investigation.

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Notes and references

- S. Elmore, *Toxicol. Pathol.*, 2007, **35**, 495.
- L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao, F. T. Wang, T. T. Zhou, B. Liu and J. K. Bao, *Cell Prolif.*, 2012, **45**, 487.
- D. R. Green and G. Kroemer, *Science*, 2004, **305**, 626.
- B. Levine and G. Kroemer, *Cell*, 2008, **132**, 27.
- O. Kepp, L. Galluzzi, M. Lipinski, J. Yuan and G. Kroemer, *Nature rev.*, 2011, **10**, 221.
- W. Zeng, X. Wang, P. Xu, G. Liu, H. S. Eden and X. Chen, *Theranostics*, 2015, **5**, 559.
- C. Allain, F. Schmidt, R. Lartia, G. Bordeaux, C. Fiorini-Debuisschert, F. Charra, P. Tauc and M. P. Teulade-Fichou, *Chembiochem.*, 2007, **8**, 424.
- B. Dumat, G. Bordeaux, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, G. Metge, C. Fiorini-Debuisschert, F. Charra and M. P. Teulade-Fichou, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 12697.
- B. Dumat, G. Bordeaux, A. I. Aranda, F. Mahuteau-Betzer, Y. El Harfouch, G. Metge, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert and M. P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 6054.
- G. Kuznetsov, M. J. Towle, H. Cheng, T. Kawamura, K. TenDyke, D. Liu, Y. Kishi, M. J. Yu and B. A. Littlefield, *Cancer Res.*, 2004, **64**, 5760.
- J. Ousingsawat, P. Wanitchakool, A. Kmit, A. M. Romao, W. Jantarajit, R. Schreiber and K. Kunzelmann, *Nat. commun.*, 2015, **6**, 6245.
- J. A. Sanchez-Alcazar, J. G. Ault, A. Khodjakov and E. Schneider, *Cell Death. Differ.*, 2000, **7**, 1090.
- E. Henry, N. Fung, J. Liu, G. Drakakaki and G. Coaker, *PLoS Genet.*, 2015, **11**, e1005199.
- L. F. Yousif, K. L. Stewart and S. O. Kelley, *Chembiochem.*, 2009, **10**, 1939.
- E. Dahlstedt, H. A. Collins, M. Balaz, M. K. Kuimova, M. Khurana, B. C. Wilson, D. Phillips and H. L. Anderson, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 897.
- M. M. Moisenovich, V. A. Ol'shevskaya, T. I. Rokitskaya, A. N. Savchenko, V. V. Tatarskiy Jr, M. A. Kaplan, V. N. Kalinin, E. A. Kotova, O. V. Uvarov, I. I. Agapov, Y. N. Antonenko and A. A. Shtil, *PLoS One*, 2010, **5**, e12717.
- F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Suss-Fink, W. H. Ang, P. J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret and B. Therrien, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 1811.
- K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr and T. Kiesslich, *Lasers Med. Sci.*, 2009, **24**, 259.

SUPPORTING INFORMATION

Differential Behaviour of Cationic Triphenylamine Derivatives in Fixed and Living Cells

R. Chennoufi,^{a,#} H. Bougherara,^{a,#} N. Gagey-Eilstein,^{a,c} B. Dumat,^b E. Henry,^{a,c} F. Subra,^a F. Mahuteau-Betzer,^b P. Tauc,^a M-P. Teulade-Fichou^{*b} and E. Deprez^{*a}

^a Laboratory of Biology and Applied Pharmacology, ENS Cachan, CNRS UMR8113, IDA FR3242, F-94235 Cachan, France

^b Laboratory of Chemistry, CNRS UMR176, Institut Curie, University of Orsay, Paris-Sud, 91405 Orsay, France

^c Present addresses: N.G-E.: CNRS UMR8638, University of Paris-Descartes, 75006 Paris; E.H.: UMR6197 CNRS / UBO / IFREMER, 29280 Plouzane, France

These authors contributed equally to this work

* Corresponding authors: deprez@lbpa.ens-cachan.fr; mp.teulade-fichou@curie.fr

Table of contents:

- Figures (S1-S14).....	pages 2-13
- Legend of the Movie S1.....	page 14
- Supplementary Materials and Methods.....	page 14
- References.....	page 16

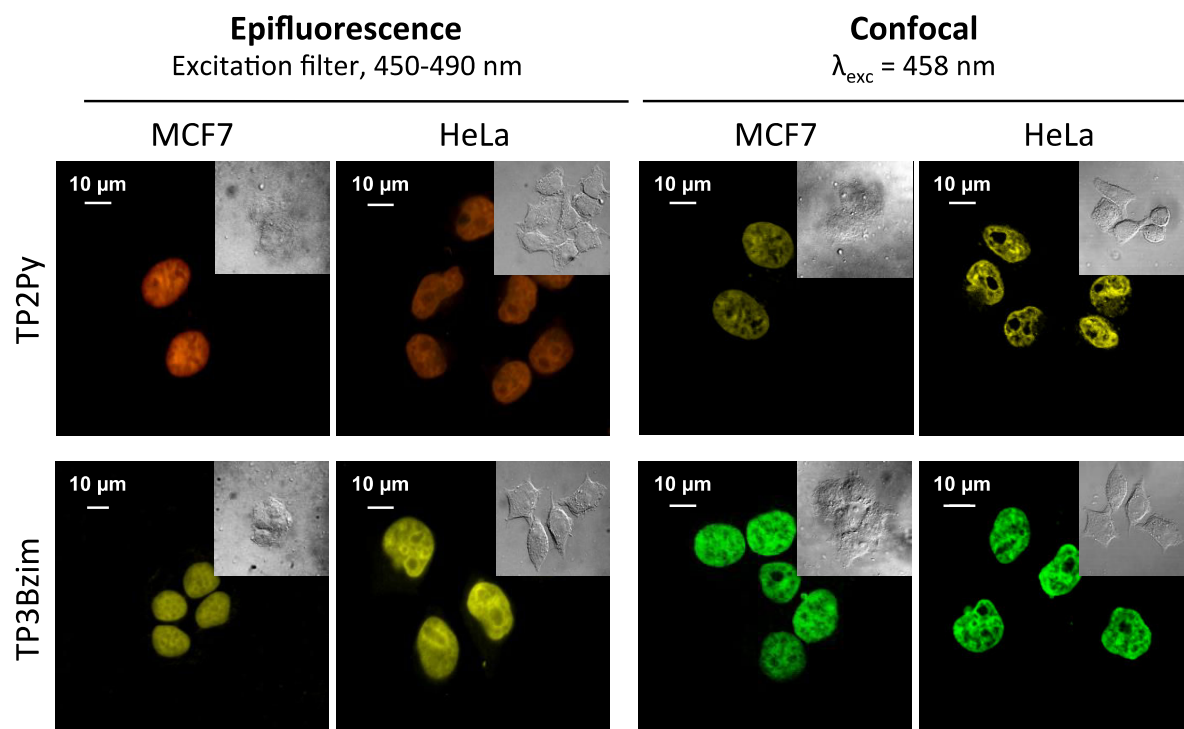


Fig. S1 Subcellular localization of TPAs in fixed cells. Epifluorescence (left) and confocal (right) imaging of fixed MCF7 or HeLa cells treated with **TP2Py** (top) or **TP3Bzim** (bottom). Cells were first fixed with 4% paraformaldehyde and then incubated with 2 μ M TPA for 2h (fixation of cells with ethanol led to similar results). The emission filter for epifluorescence was 515-700 nm. The emission slit setting for confocal imaging was 560-720 and 530-690 nm for **TP2Py** and **TP3Bzim**, respectively. Insets: corresponding DIC (differential interference contrast) transmission images.

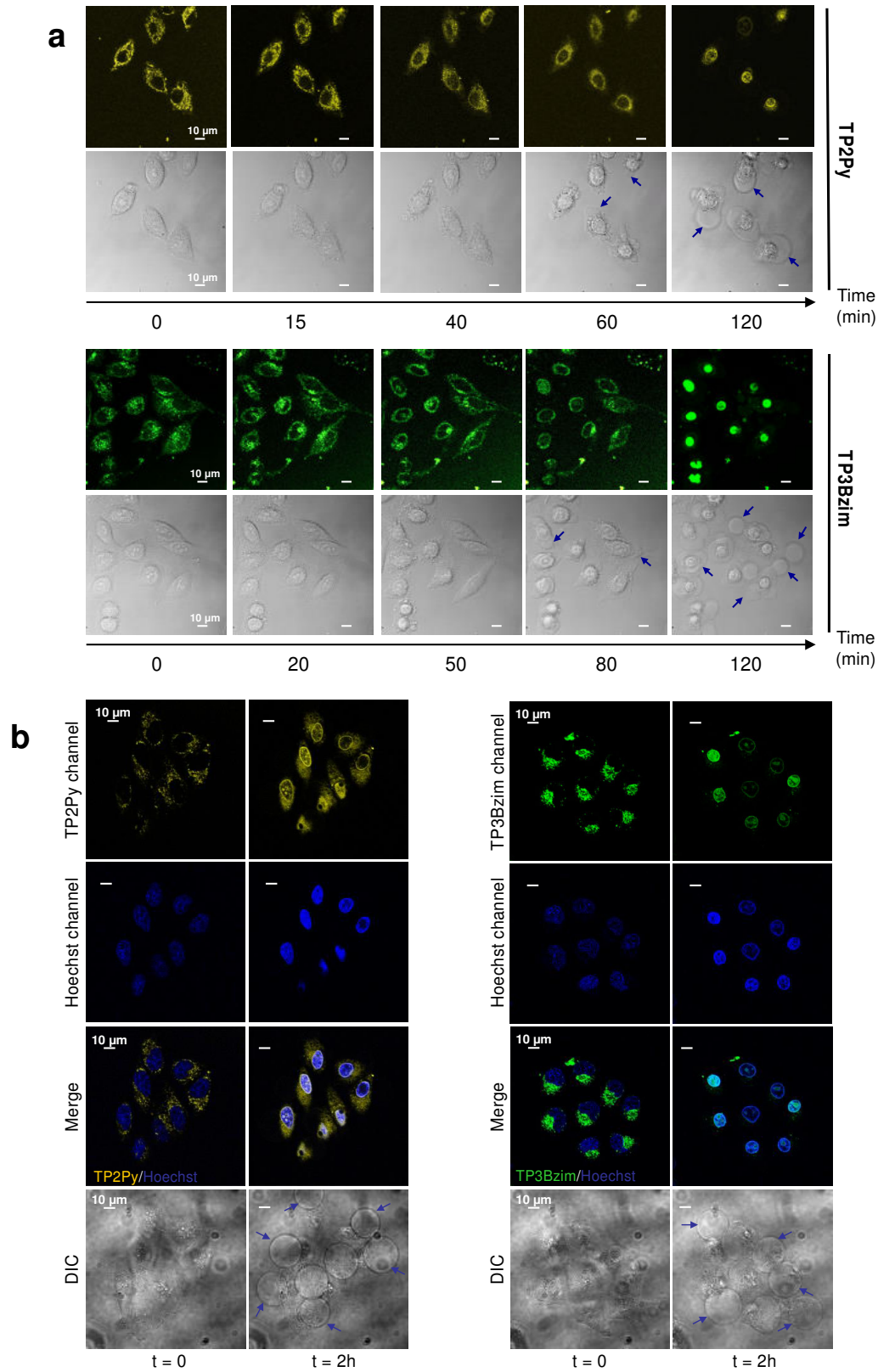


Fig. S2 Confocal fluorescence imaging of living HeLa cells treated with TPAs. (a) The fluorescence signal of TPAs (top: **TP2Py**; bottom: **TP3Bzim**) is mainly localized in the cytoplasm at $t = 0$ and relocalizes to the nucleus under light illumination ($\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$; irradiance, 30 mW/cm^2) in a similar manner to that observed for MCF7 cells (Fig. 1). HeLa cells were pre-incubated with $2 \mu\text{M}$ TPA for 2h at 37°C before irradiation. (b) Similar experimental conditions as shown in panel a except that HeLa cells were pre-incubated with $2 \mu\text{M}$ TPA (left: **TP2Py**; right: **TP3Bzim**) and $1 \mu\text{M}$ Hoechst 33342. Excitation wavelengths of TPAs and Hoechst were 458 and 750 nm, respectively. Emission slit settings: 560-720, 530-690 and 406-506 nm for **TP2Py**, **TP3Bzim** and Hoechst, respectively. Merge: After 2h irradiation (2nd column), white and cyan areas indicate colocalizations of **TP2Py**/Hoechst and **TP3Bzim**/Hoechst, respectively. Corresponding DIC transmission images illustrating the concomitant membrane blebbing (blue arrows) are shown below the fluorescence images.

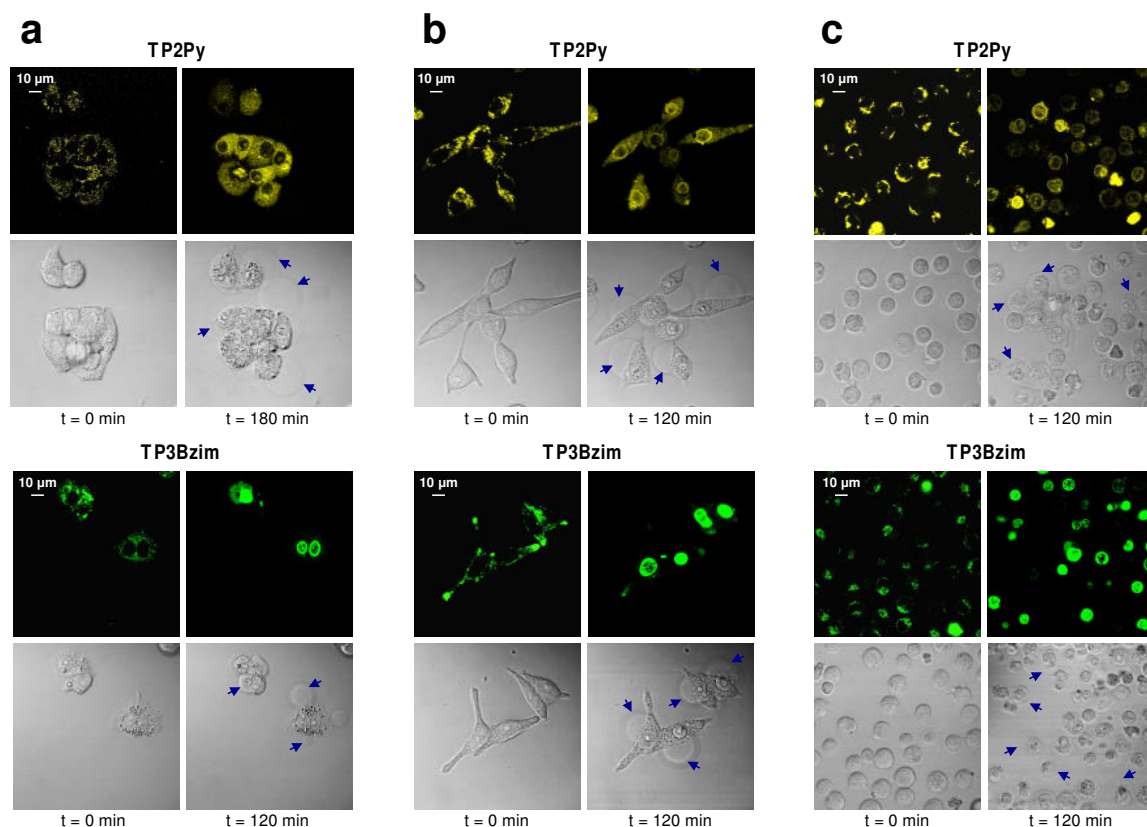


Fig. S3 Confocal fluorescence imaging of living HepG2 (a), LNCaP (b) and Jurkat (c) cells treated with TPAs. The fluorescence signal of TPAs (top: **TP2Py**; bottom: **TP3Bzim**) is mainly localized in the cytoplasm at $t = 0$ and relocalizes to the nucleus under light illumination ($\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$; irradiance, 30 mW/cm^2) in a similar manner to that observed for MCF7 (Fig. 1) and HeLa cells (Fig. S2). The different cells were pre-incubated with $2 \mu\text{M}$ TPA for 2h at 37°C before irradiation. Emission slit settings: 560-720 and 530-690 nm for **TP2Py** and **TP3Bzim**, respectively. Corresponding DIC transmission images illustrating the concomitant membrane blebbing (blue arrows) are shown below the fluorescence images.

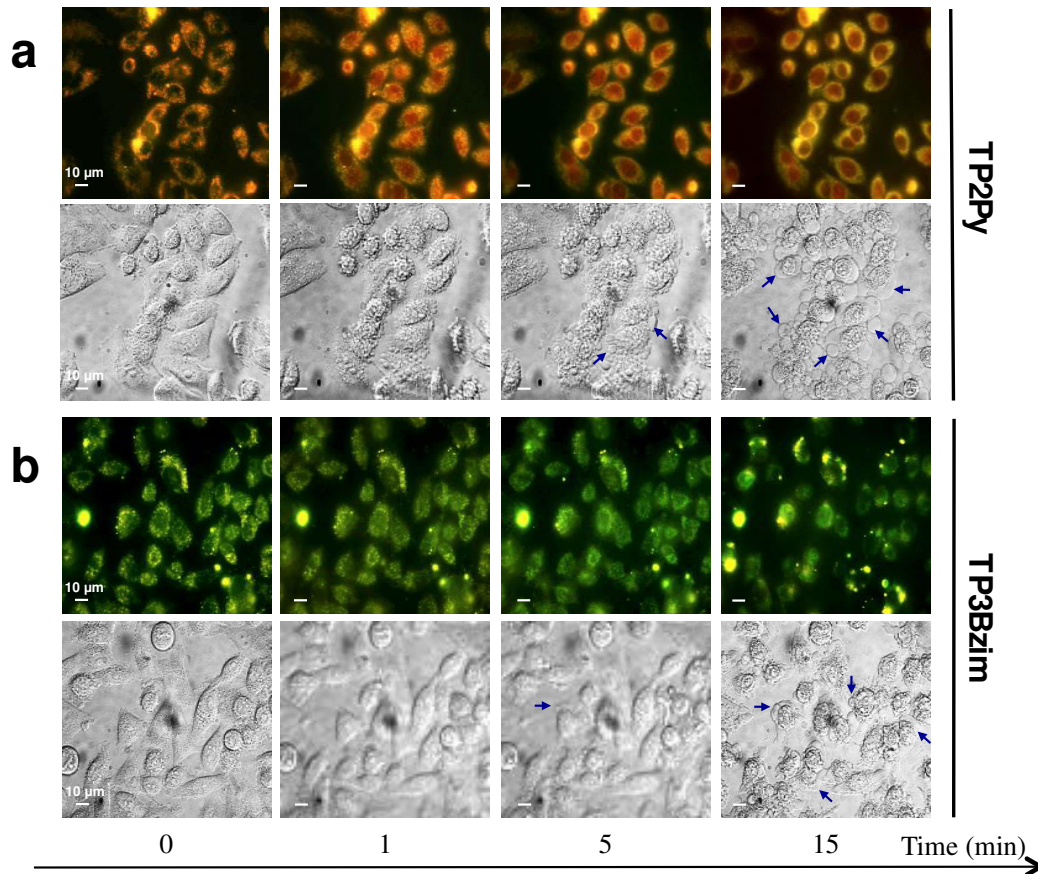


Fig. S4 Epifluorescence imaging of living HeLa cells treated with TPAs. Time-dependent re-localization of the fluorescence signal from the cytoplasm to the nucleus after light excitation of **TP2Py** (a) or **TP3Bzim** (b). Corresponding DIC transmission images illustrating the concomitant membrane blebbing (blue arrows) are shown below the fluorescence images. HeLa cells were pre-incubated with 2 μM TPA for 2h at 37°C before observation. Excitation filter, 450-490 nm; emission filter, 515-700 nm. Irradiance, 1.8 W/cm². The subcellular localization of TPAs in living HeLa cells, at early times of observation, was mainly cytoplasmic. The observation/excitation in the epifluorescence mode triggered a rapid relocalization of the fluorescence signal from the cytoplasm to the nucleus. This nuclear translocation began at t=1 min (corresponding to a light dose or fluence of 108 J/cm²) and nuclear accumulation was optimal between 5 and 15 min. The formation of membrane blebs was detected in the transmission mode at t=5 min and subsequent dramatic morphological changes (nucleus and cell shrinkages) were observed at t=15 min, highly suggesting that cells underwent apoptosis, confirming confocal observations (Fig. 1 & Figs S2-S3). Similar results were obtained with living MCF7 cells (data not shown).

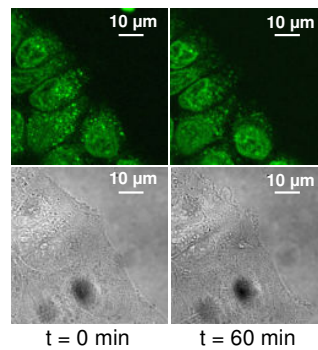


Fig. S5 Confocal fluorescence imaging of living MCF7 cells treated with 2 μM of a neutral TPA, **TP3^NBzim**, for 2h at 37°C before observation. Left, initial observation (t=0). Right, observation after an illumination time of 60 min (λ_{exc} = 458 nm; irradiance, 30 mW/cm²). Top: fluorescence; bottom: DIC transmission.

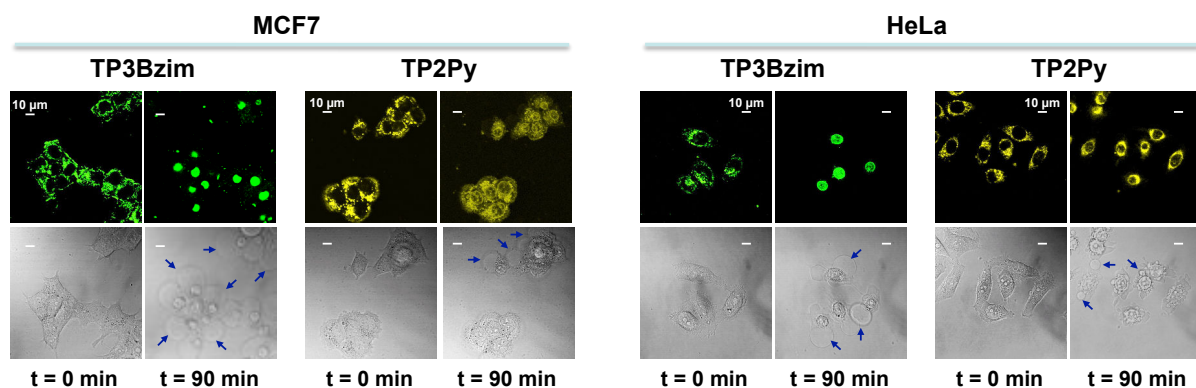


Fig. S6 Photoactivation by an external source of light is strictly required for nuclear translocation of TPAs and concomitant membrane blebbing. Confocal imaging of living MCF7 or HeLa cells pre-treated with $2\mu\text{M}$ **TP3Bzim** or **TP2Py** for 16h at 37°C before observation. Left: initial observation ($t = 0$) just after the 16h-incubation step showing that the initial cytoplasmic localization of TPAs was consistently observed, regardless of the incubation time, 16h or 2h (compare with Fig. 1 and Figs S2-S3). Furthermore, similar results were obtained, irrespective of the procedure used for the pre-incubation step (TPA-treated cells pre-incubated in the dark or exposed to daylight). Right: Photo-induced nuclear translocation of TPAs accompanied by the appearance of membrane blebs (blue arrows in the transmission mode) as observed at $t = 90$ min, showing that the 16h-incubation step did not influence the subsequent kinetics of nuclear translocation or membrane blebbing. $\lambda_{\text{exc}} = 458$ nm; irradiance, $30 \text{ mW}/\text{cm}^2$; emission slit settings: 560-720 nm and 530-690 nm for **TP2Py** and **TP3Bzim**, respectively.

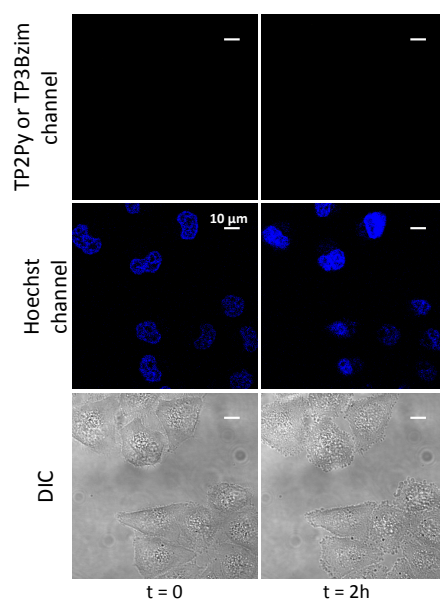


Fig. S7 Confocal fluorescence imaging of irradiated living HeLa cells in the absence of TPA. HeLa cells were incubated with Hoechst 33342 only ($1\mu\text{M}$) and exposed to visible light irradiation for 2h ($\lambda_{\text{exc}} = 458$ nm; irradiance, $30 \text{ mW}/\text{cm}^2$). As expected, no fluorescence of TPA was observed in the **TP2Py** channel (emission slit setting: 560-720 nm) or the **TP3Bzim** channel (emission slit setting: 530-690 nm). Hoechst channel: 406-506 nm (excitation: 750 nm). The corresponding DIC transmission images did not show any membrane blebbing in contrast to that observed in the presence of TPA (compare with Fig. 1 and Figs S2-S3).

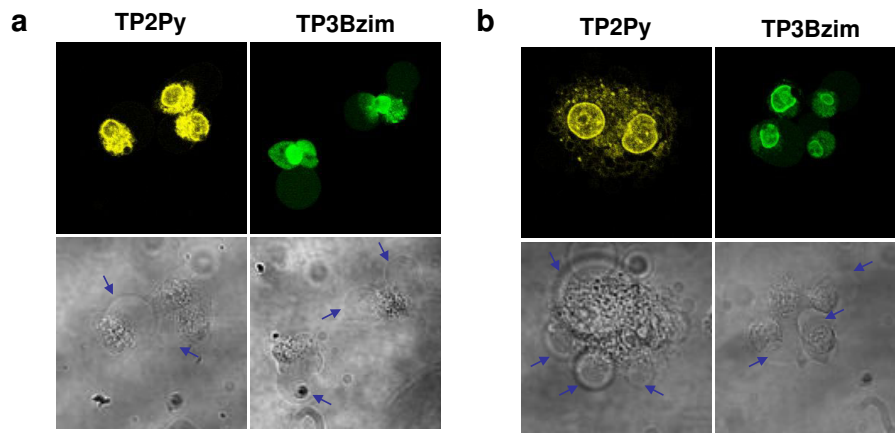


Fig. S8 Initial nuclear location of TPA after treatment with camptothecin (CPT). (a) Living HeLa cells were pre-incubated with **TP2Py** or **TP3Bzim** (2 μM) for 2h at 37°C and further incubated with CPT (20 μM) for 2h at 37°C before observation. (b) Living HeLa cells were preincubated with CPT (20 μM) for 2h at 37°C and further incubated with **TP2Py** or **TP3Bzim** (2 μM) for 2h at 37°C before observation. Both procedures led to similar observations, i.e. an initial nuclear location of the TPA fluorescence signal (instead of the initial cytoplasmic location using TPA-treated cells in the absence of CPT), which can only be due to the proper effect of CPT since the duration of the incubation time has no effect on the initial cytoplasmic location of TPAs in the absence of any other apoptotic factor (see Figs 1, S2, S3 and S6). Excitation: 458 nm; emission slit settings: 560-720 and 530-690 nm for **TP2Py** and **TP3Bzim**, respectively. Corresponding DIC transmission images illustrating the concomitant membrane blebbing (blue arrows) are shown below the fluorescence images.

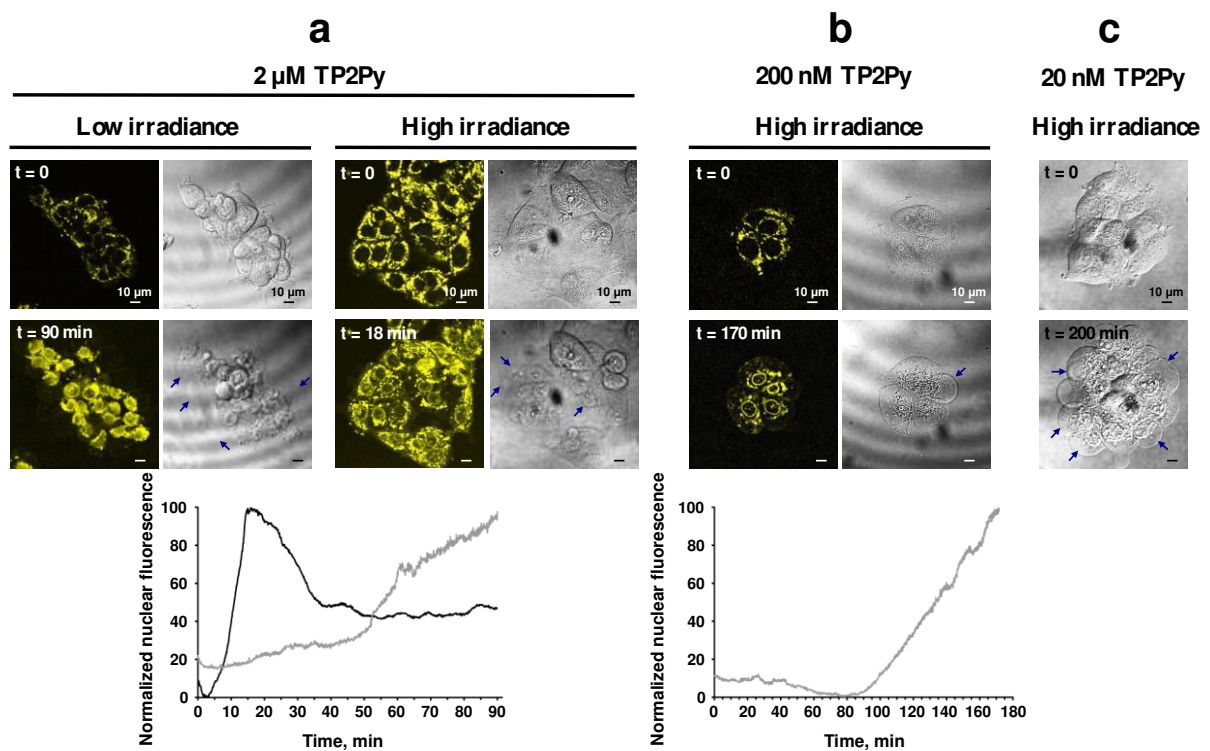


Fig. S9 Influences of the irradiance and concentration on the kinetics of nuclear re-localization of TPAs. (a) Living MCF7 cells were treated with 2 μM **TP2Py** for 2h at 37°C and observed using confocal microscopy at two irradiances (left, 5.6 mW/cm^2 ; right, 30 mW/cm^2). Top: fluorescence and DIC transmission images at $t = 0$, corresponding to the initial observation (beginning of the excitation). Bottom: fluorescence and transmission images at a time corresponding to the first peak of nuclear accumulation (as shown in Fig. 1c). The kinetics of nuclear accumulation of **TP2Py** are shown below for two irradiance values: 5.6 mW/cm^2 (grey) or 30 mW/cm^2 (black). $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$; emission slit setting: 560-720 nm. (b-c) Same conditions as above except that the **TP2Py** concentration was decreased: 200 and 20 nM, respectively (irradiance, 30 mW/cm^2). The fluorescence image corresponding to $[\text{TP2Py}] = 20 \text{ nM}$ is not shown for detection reasons, although membrane blebbing (blue arrows) is clearly visible in the transmission mode.

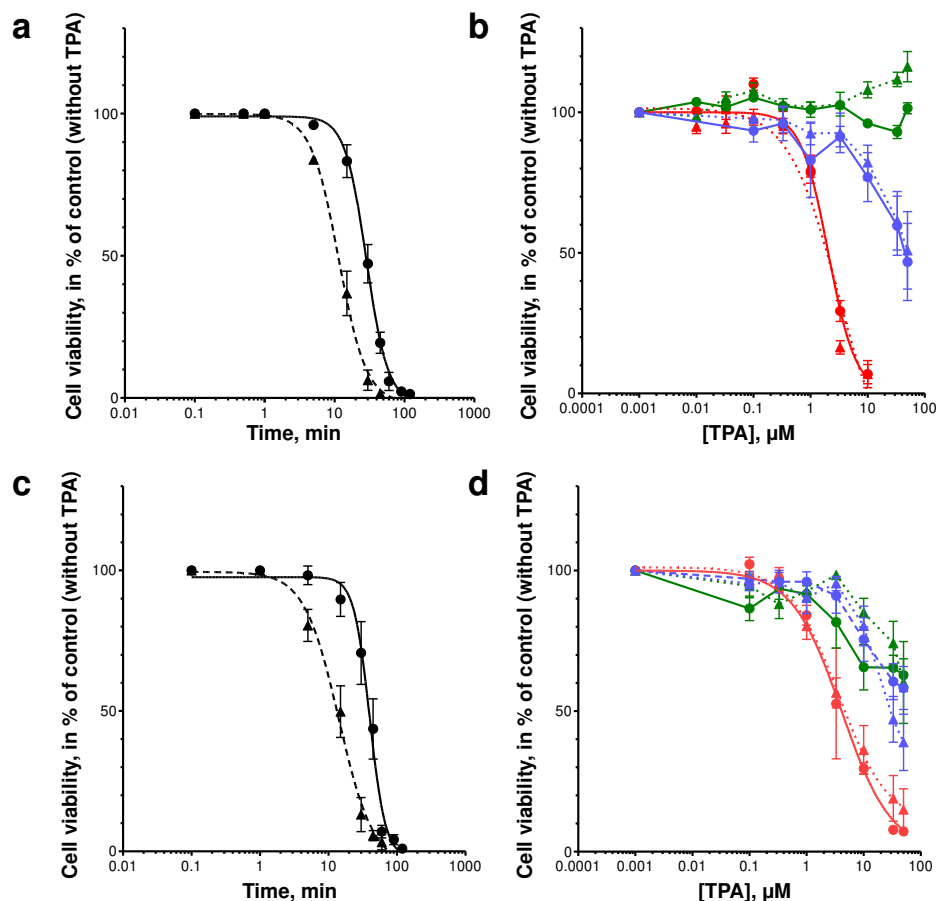


Fig. S10 Photocytotoxicity of TPAs in HeLa (a & b) and MCF7 (c & d) cells. Cell viability (in % of untreated cells) as a function of illumination time (for a given TPA concentration) (a & c) or as a function of TPA concentration (for a given illumination time) (b & d).

(a & c) Cells were treated with 2 μM **TP2Py** (black circles) or **TP3Bzim** (black triangles) for 2h at 37°C and further illuminated at 452 nm for varying times. The times of light exposure lethal for 50% of the cells (LT_{50}) were 15 and 30 min for TP3Bzim and TP2Py, respectively, in HeLa cells (corresponding light dose values: 15.3 and 30.6 J/cm^2 , respectively). LT_{50} were 15 and 40 min for TP3Bzim and TP2Py, respectively, in MCF7 cells (corresponding light dose values: 15.3 and 40.8 J/cm^2 , respectively).

(b & d) Cells were treated with varying concentrations of TPA (circles: **TP2Py**; triangles: **TP3Bzim**) and subjected to light irradiation at 452 nm during a time period corresponding to LT_{50} (red curves) as determined in panels a & c, subjected to daylight illumination for 30 min (blue curves) or protected from light (green curves).

The source of excitation was a Mercury lamp (130 W, wavelength 380-600 nm) coupled to a filter ($\lambda = 452 \pm 45\text{nm}$); irradiance, 17 mW/cm^2 .

In HeLa cells, LT_{50} values (time of light exposure lethal for 50% of the cells) were 30 and 15 min for **TP2Py** and **TP3Bzim**, respectively (corresponding to light dose values of 30.6 and 15.3 J/cm^2 , respectively) indicating that **TP3Bzim** was a slightly more potent cell death inducer than **TP2Py** under this illumination condition ($\text{LT}_{50} = 40$ and 15 min for **TP2Py** and **TP3Bzim** in MCF7 cells, corresponding to light dose values of 40.8 and 15.3 J/cm^2 , respectively). For HeLa cells, the dark toxicity was negligible up to 50 μM TPA. Moreover, at the TC_{50} value (2 μM ; concentration of TPA leading to 50% lethality under light irradiation at 452 nm), no toxicity was detected with daylight exposure. However, a slight daylight toxicity was observed with TC_{50} values around 50 μM for both TPAs. Accordingly, we observed both membrane blebbing and nuclear translocation of TPAs after 2-hour incubation of 30-50 μM TPA with HeLa cells exposed to daylight (data not shown). General characteristics were similar using MCF7 cells. Although moderate, the dark toxicity of TPAs was higher in MCF7 than in HeLa cells ($\text{TC}_{50} = 60$ -65 μM). Taken together, these results confirm that TPAs induce light-dependent cell death in the low micromolar range, in agreement with imaging experiments; dark or daylight toxicities are negligible or moderate below 30 μM .

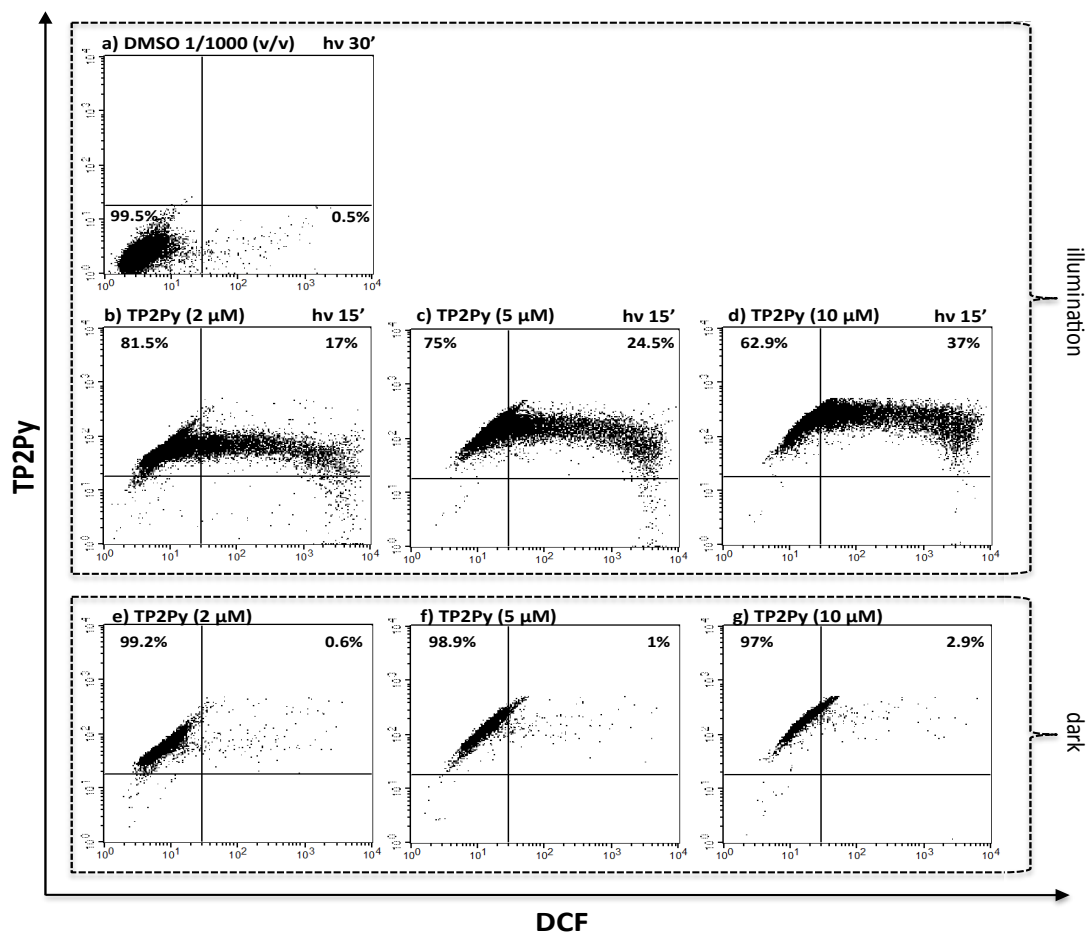


Fig. S11 Concentration dependence of ROS production upon photoactivation of TPAs. Living HeLa cells were plated (in 12-well plates) and treated with varying concentrations of **TP2Py**: 2 μ M (*b* & *e*), 5 μ M (*c* & *f*) or 10 μ M (*d* & *g*). Before addition of 20 μ M H₂DCF-DA and flow cytometric analysis, the cells were subjected (*b-d*) or not (*e-g*) to light exposure. Negative control (cells treated with DMSO alone and subjected to light illumination) is shown in *a*. The source of excitation was a Mercury lamp (130 W; 380-600 nm) with an excitation filter centered at 452 nm (\pm 45 nm); irradiance, 17 mW/cm². The horizontal and vertical axes correspond to fluorescence intensities of DCF and **TP2Py**, respectively.

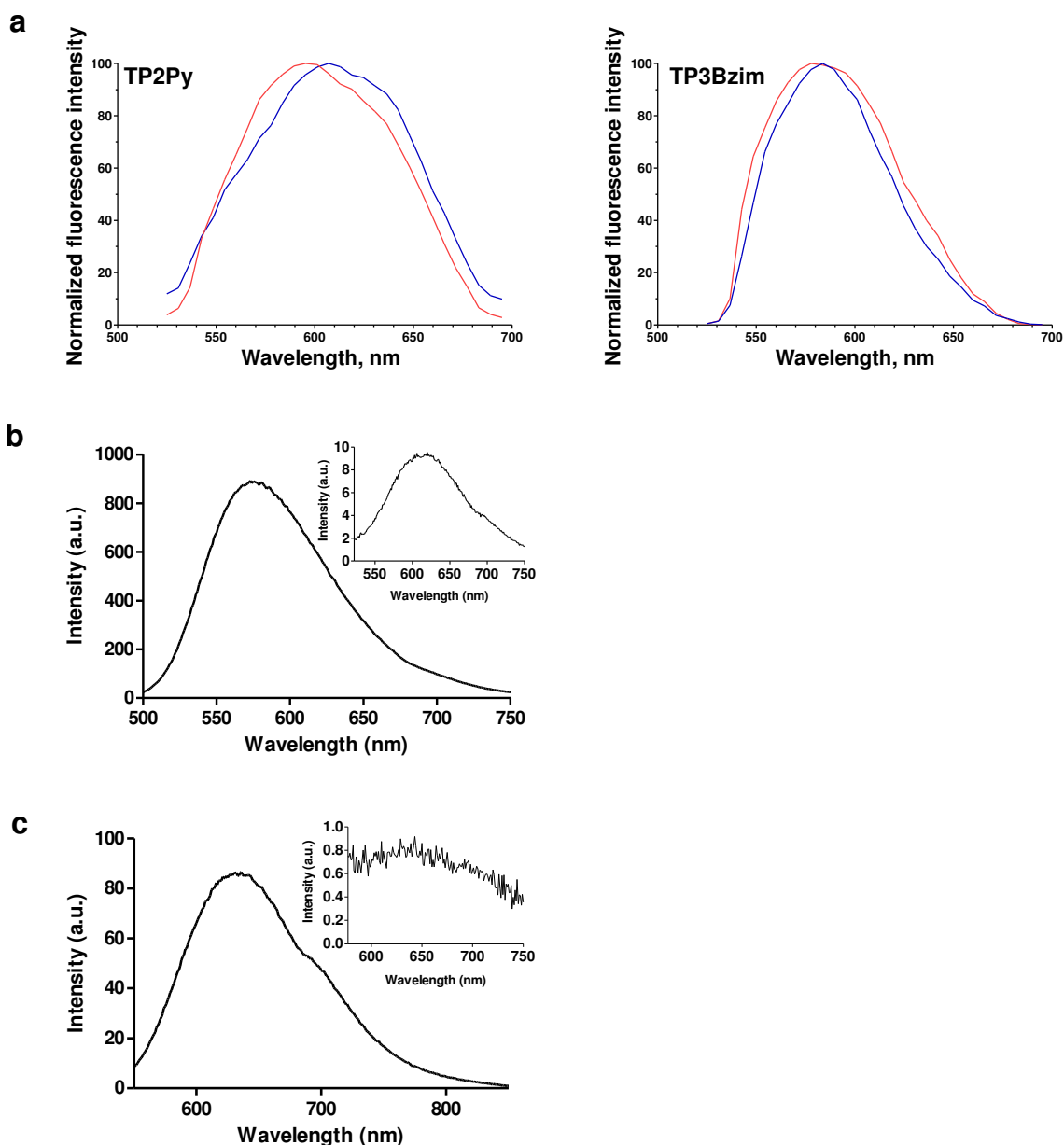


Fig. S12 Fluorescence emission spectra of **TP2Py** (left) and **TP3Bzim** (right) in distinct ROIs (region of interest; see Fig. 1c) corresponding to the nucleus (blue) or the cytoplasm (red) of MCF7 cells (a). The emission spectrum of **TP3Bzim** in the cell context was unchanged (maximum about 580 nm), regardless of its localization (nuclear or cytoplasmic). This emission is close to the characteristic maximum found *in vitro* for the bound form of **TP3Bzim**, 572 nm (for example, when bound to DNA; panel b: $\lambda_{\text{exc}} = 457$ nm) and significantly different from the maximum characterizing the free compound, 620 nm (inset of panel b: $\lambda_{\text{exc}} = 433$ nm). Such a conclusion is not direct in the case of **TP2Py** as the emission maxima are similar *in vitro* for bound (panel c: $\lambda_{\text{exc}} = 506$ nm) and for free (inset of panel c: $\lambda_{\text{exc}} = 473$ nm) forms, 637 and 633 nm, respectively; the fluorescence emission spectra of **TP2Py** in nuclei and in cytoplasm were compatible with these emission spectra (the maximum of emission was centered at 615 nm in nuclei and slightly blue-shifted in the cytoplasm: 602 nm).

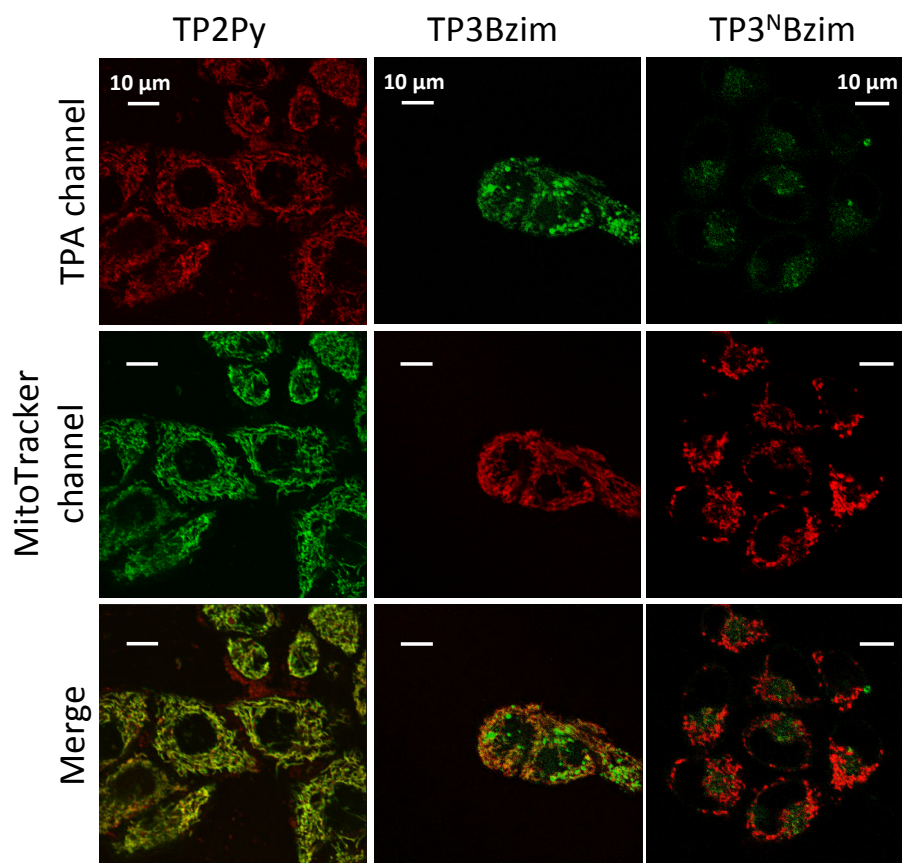


Fig. S13 Colocalization between cationic TPAs and mitochondria in HeLa cells before light-induced nuclear translocation. Mitochondria staining was performed with a green tracker of mitochondria (MitoTracker® Green FM; $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$ / emission: 500-550 nm) for **TP2Py**, and a red tracker (MitoTracker® Red FM; $\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$ / emission: 650-700 nm) for both **TP3Bzim** and **TP3^NBzim**. TPA channel: $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$ / emission slit settings: 560-720 and 530-690 nm for **TP2Py** and **TP3Bzim/TP3^NBzim**, respectively. Top: imaging channel of TPA; middle: imaging channel of MitoTracker; bottom: corresponding merged images. Yellow to orange areas indicate colocalization of TPA/mitochondria. Only the two cationic compounds, **TP2Py** and **TP3Bzim**, but not the neutral **TP3^NBzim** compound, display a significant colocalization signal with mitochondria.

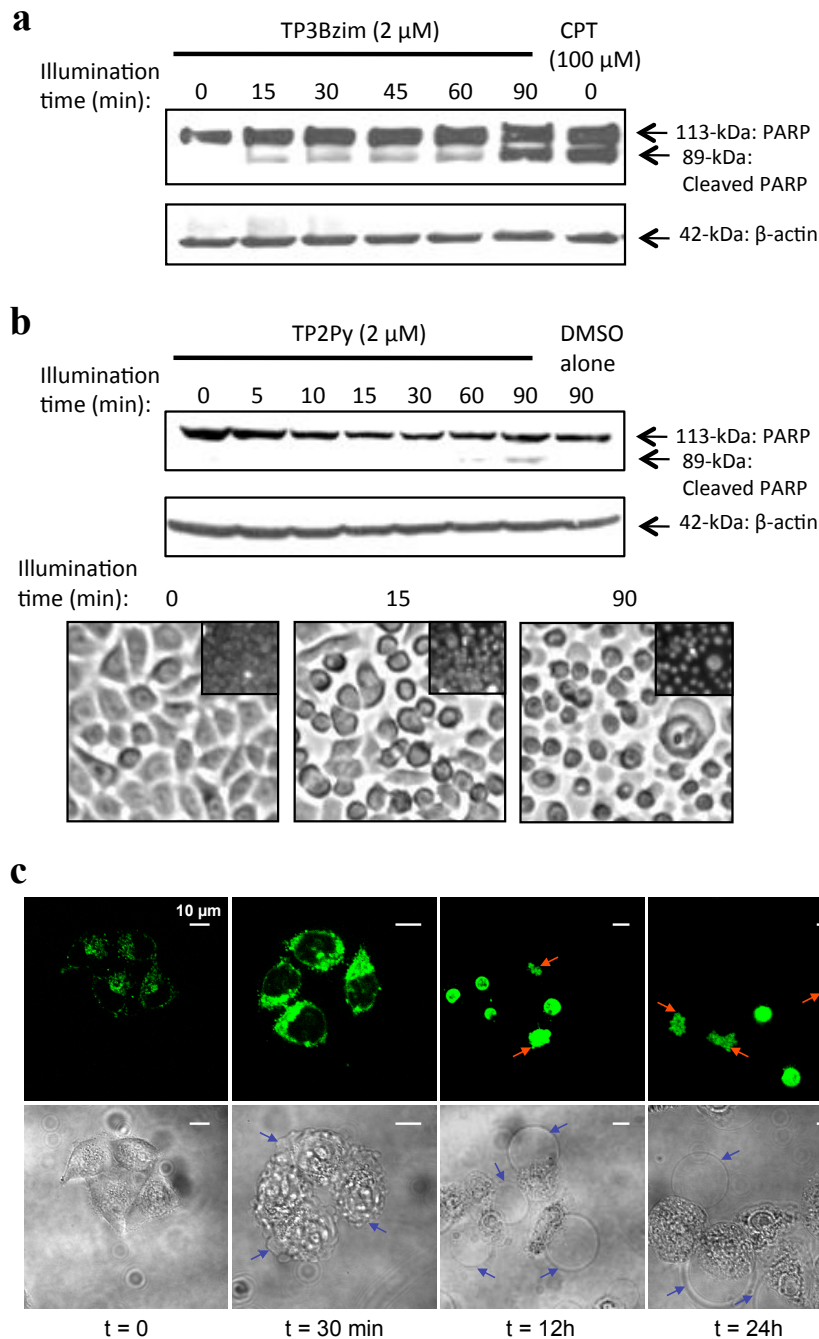


Fig. S14 TPAs induce cell apoptosis upon light illumination as revealed by the PARP-1 cleavage assay. HeLa cells were plated (in 12 well-plates) and treated with 2 μ M **TP3Bzim** (a) or **TP2Py** (b). After 2h incubation at 37°C, the cells were illuminated at 452 nm during varying times (up to 90 min). The source of excitation was a Mercury lamp (130 W, wavelength 380-600 nm) coupled to a filter ($\lambda = 452 \pm 45$ nm); irradiance, 17 mW/cm². At the end of illumination, the cells were lysed and the cleavage of PARP-1 was detected by Western blot analysis (typically 40 μ g proteins/lane), using an anti-PARP-1 antibody that recognizes both the entire (113-kDa) and cleaved PARP-1 (89-kDa). The immunodetection of β -actin (42-kDa) was used as an internal loading control. Camptothecin (CPT; 100 μ M) and DMSO (1% (v/v)) under illumination condition were used as positive and negative controls, respectively. Panel b, bottom: transmission images showing the morphology of HeLa cells after incubation with **TP2Py** (2 μ M) without any light illumination treatment (left) or with a light illumination treatment of 15 min (middle) or 90 min (right). Insets: epifluorescence images. (c) Confocal fluorescence imaging of **TP3Bzim**-treated HeLa cells. HeLa cells were pre-incubated with 2 μ M **TP3Bzim** for 2h at 37°C and observed before (t = 0) and after 30-min light irradiation (t = 30 min) using the Mercury lamp as described above. **TP3Bzim**-treated HeLa cells were then kept in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C and observed at 12h and 24h post-irradiation. The red arrows indicate events of nucleus disintegration. Corresponding DIC transmission images illustrating membrane blebbing (blue arrows) are shown below the fluorescence images.

The cleavage of PARP-1 was assessed by Western blot using an anti-PARP-1 antibody that recognizes both the entire and cleaved PARP-1 (Fig. S14a-b). HeLa cells were pre-treated with either **TP3Bzim** or **TP2Py** (2-h incubation) and further illuminated at 452 nm for various illumination times (up to 90 min). PARP-1 cleavage was detected in the presence of both compounds and its intensity was dependent on the illumination time; no cleavage was observed with untreated cells (DMSO only) after 90-min illumination. However, a differential efficiency of **TP2Py/TP3Bzim** was observed: **TP3Bzim** led to a significant PARP-1 cleavage after 15-min illumination (the cleavage efficiency after 90-min illumination was comparable with the one obtained under CPT treatment) whereas **TP2Py**-dependent PARP-1 cleavage was observed after a significantly longer illumination time (typically 60 min). Such a quantitative differential effect of the two compounds on PARP-1 cleavage is in accordance with photocytotoxicity results, due to the illumination condition (452 ± 45 nm) which is more favourable to **TP3Bzim** ($\lambda_{\text{abs}} = 457$ nm) than **TP2Py** ($\lambda_{\text{abs}} = 506$ nm). The detection of PARP-1 cleaved products was accompanied by alteration of the cell morphology induced by the combination of TPA and light illumination. Indeed, after a 2-h pre-incubation with **TP2Py** but without any light illumination, HeLa cells displayed a normal morphology in transmission images. After 15-min illumination, a few cells were detached, whereas all the cells displayed morphological alterations such as cell shrinkage typically observed during apoptosis, after 90-min illumination. More dramatic morphological change such as nucleus disintegration was observed from $t = 12$ h (and confirmed at $t = 24$ h) after visible light irradiation (30-min illumination; Fig. S14c).

Movie S1 Video movies (17s each; acceleration x900: 1s <-> 15min) showing the photo-induced cell death of MCF7 cells in the presence of **TP3Bzim**. (a) Confocal images. (b) DIC transmission images. (c) Merged images. Experimental conditions are similar to those mentioned in the legend of Fig. 1.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Synthesis and reagents.

Synthesis of TP2Py (4,4'-bis[(E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl]triphenylamine bis-methiodide) and *TP3Bzim* (2,2',2''-((1E,1'E,1''E)-(nitritotris(benzene-4,1-diyl))tris(ethene-2,1-diyl))tris(1,3-dimethyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium)iodide) were performed as previously described.¹

Synthesis of TP3^NBzim (tris[4-(1H-benzimidazol-2-ylethenyl)phenyl]amine). To a suspension of 4,4'-trisformyltriphenylamine (120 mg, 1 equiv.) and phosphonium salt (625 mg, 4 equiv.) in 15 ml of dry methanol was added sodium methylate (15 equiv.) in methanol. The mixture was stirred for 24h in the dark and then concentrated to dryness. The residue was diluted in dichloromethane. Pentane was added until precipitation of a yellow solid. The precipitate was filtered under reduced pressure, washed with pentane and dried under vacuum to afford 165 mg (86%) of the expected compound. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 13.07 (s, 3H), 7.79-7.59 (m, 9H), 7.59-7.46 (m, 6H), 7.27-7.05 (m, 15H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 150.6, 150.3, 147.1, 137.2, 135.3, 130.4, 128.0, 123.8, 122.6, 113.8, 113.5; MS (ESI+) m/z 672.3.

Reagents. Tert-butyl hydroperoxide (TBHP), camptothecin (CPT), N-acetyl cysteine (NAC), cyclosporine A (CsA) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) were from Sigma-Aldrich. Phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF) and sodium orthovanadate were from Thermo Scientific Pierce and EMD Millipore, respectively. Hoechst 33342 was from Molecular probes.

Cell lines. Five human cancer cell lines were tested throughout this study: HeLa (cervical cancer), MCF7 (breast cancer), LNCaP (prostate adenocarcinoma), HepG2 (hepatocellular liver carcinoma) and Jurkat cells (T-lymphoid leukemia cell line).

Spectroscopic characterization and instrument set-up for fluorescence imaging. Fluorescence emission spectra of TPAs were measured at 25°C on a Cary-Eclipse spectrofluorimeter (Varian, CA, USA) equipped with a thermostated cell holder, using solutions (70 µl) placed in microcuvettes (pathlength, 0.3 cm). The PMT (photomultiplier tube) voltage was 630 V. The TPA concentration was 5 µM in Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 100 mM KCl) in the presence or absence of 10 µM 21-mer double-stranded DNA (U5A/B); U5A (5'-cct gct agg gat ttt cct gcc-3') and its complementary strand were annealed as previously described.²

Epifluorescence and confocal images were obtained using a SP2 confocal microscope (Leica MicroSystem) equipped with an oil immersion x63 objective (numerical aperture, 1.32) and an incubation chamber (37°C, CO₂ 5%). Excitation and emission filters for epifluorescence were 450-490 nm and 515-700 nm, respectively. A continuous laser line (458 nm) was used for excitation of TPAs in the confocal mode (emission slit settings are specified in figure legends). The irradiances were calculated by measuring the power at the exit of the objective using a Vega power meter (Ophir). The power measurement for confocal experiments was performed in the x-y scan mode (image size, 512x512 pixels; field of view, 140x140 µm; scanning frequency, 800 Hz). The illuminated surface area was 10⁻³ cm² in the epifluorescence mode. Fluorescence emission spectra of TPAs in the cellular context were monitored using the lambda-scan mode of the confocal microscope. Two-photon excitation of Hoechst 33342 was performed using a 80-MHz mode-locked Mai-Tai® Ti:Sapphire tunable laser (720-920 nm, 100 fs laser pulse; Spectra Physics, Mountain View, California) tuned to 750 nm.

Colocalization experiments with mitochondria. HeLa cells were pre-treated with TPA for 2h at 37°C. The cells were then washed with PBS buffer (phosphate-buffered saline, pH 7.5, Gibco®) and further incubated with 20 nM MitoTracker® (Invitrogen) for 30 min. For TP2Py (red emission) and TP3Bzim/TP3^NBzim (green emission), MitoTracker® Green FM and MitoTracker® Red FM were used, respectively. Concentrations of TPAs were 2 µM (TP2Py & TP3Bzim) or 10 µM (TP3^NBzim).

Photocytotoxicity experiments. HeLa or MCF7 cells were plated in 96-well plates ($5 \cdot 10^3$ cells/well), pre-incubated with TPAs for 2h in the dark at 37°C and subjected to light exposure. The excitation source was a Mercury lamp (130 W; 380-600 nm) equipped with an excitation filter centered at 452 nm (± 45 nm) (irradiance, 17 mW/cm², measured using a Vega power meter on a total illuminated surface of 3.8 cm² (equiv. 4 wells)). TPA concentrations and illumination times are indicated in the corresponding figure legend. After further incubation of treated cells for 24h at 37°C, cell viability was determined by a colorimetric MTT assay, according to a standard protocol.³ The absorbance at 570 nm was measured using a VictorTM X5 microplate reader (Perkin Elmer).

PARP-1 detection by western blotting analysis. HeLa cells were plated in 12-well plates ($2 \cdot 10^5$ cells/well) and pre-incubated with 2 μ M TPA for 2h in the dark at 37°C. After varying illumination times at 17 mW/cm² (Mercury lamp (130 W; 380-600 nm) + excitation filter centered at 452 nm (± 45 nm); total illuminated surface: 3.8 cm² (equiv. 1 well)), cells were collected by scraping, washed once in ice-cold PBS, treated with lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 137 mM NaCl, 10% glycerol (v/v), 1% Nonidet P-40 (v/v)) supplemented with 1mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate and anti-protease cocktail (Complete, Boehringer Mannheim, Germany)) for 20 min on ice and further centrifuged at 10,000 g for 10 min. Protein concentration was determined using the bicinconinic acid method (micro BCA, Pierce, USA). Detergent soluble proteins (40 μ g) were separated by SDS-PAGE (4-12% polyacrylamide gradient gel) under reducing conditions followed by Western blotting. Membranes were first incubated overnight at 4°C with the rabbit primary polyclonal antibody anti-PARP-1 (#9542, Cell Signaling Technology). Membranes were then probed with horseradish peroxidase-labelled anti-rabbit IgG (dilution 1/2000; Dakocytomation). Detection was based on a chemiluminescence detection system (GE Healthcare, Orsay, France).

Fluorescence detection of ROS generation. ROS detection was performed using H₂DCF-DA with TP2Py only for spectral reasons.

For flow cytometric analysis, HeLa cells were plated in 12-well plates ($2 \cdot 10^5$ cells/well) and pre-incubated with 2 μ M TP2Py for 2h at 37°C. After light exposure for 30 min using a Mercury lamp (130 W; 380-600 nm; excitation filter centered at 452 nm (± 45 nm); irradiance: 17 mW/cm²; total illuminated surface: 3.8 cm² (equiv. 1 well)), the cells were treated with H₂DCF-DA according to the manufacturer's instructions (Sigma). After H₂DCF-DA treatment, the cells were trypsinized and centrifuged at 1,500 rpm for 5 min. The cell pellets were resuspended in DMEM (Gibco®) supplemented with 10% FBS (Gibco®) and analysed by FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson). Fluorescence signals of DCF and TP2Py were measured by using FL1 and FL2 channels, respectively. For the experiment in the presence of NAC, the protocol was the same except that the cells were first pre-incubated with 3 mM NAC for 12h at 37°C before the addition of TP2Py. For the experiment in the presence of CsA, the compound was added to the cells (final concentration of 10 μ M) 90 min after the addition of TP2Py and 30 min before light illumination. These concentrations of NAC and CsA were chosen because they did not induce significant cell toxicity *per se*, as measured by MTT assay: NAC was not toxic up to 5 mM (100% viability) while NAC displayed significant toxicity beyond 5 mM (45% viability at 10 mM) (not shown). CsA was not or slightly toxic up to 18 μ M (>90% viability; 80% viability at 25 μ M) (not shown). Three negative control experiments were performed: DMSO alone (1/1000 (v/v)) with or without light illumination, or 2 μ M TP2Py without light illumination. One positive control experiment was performed using cells incubated with the oxidative stress inducer TBHP (100 μ M) for 3h at 37°C (without light illumination).

Direct ROS detection in living MCF7 cells was performed using confocal fluorescence imaging. TPA-treated cells were incubated with H₂DCF-DA as explained in the corresponding figure legend. A continuous laser line (488 nm) was used for excitation of DCF (emission slit setting: 500-530 nm).

REFERENCES

- 1 (a) B. Dumat, G. Bordeaux, A. I. Aranda, F. Mahuteau-Betzer, Y. El Harfouch, G. Metge, F. Chara, C. Fiorini-Debuisschert and M. P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 6054; (b) B. Dumat, G. Bordeaux, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, G. Metge, C. Fiorini-Debuisschert, F. Charra and M. P. Teulade-Fichou, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 12697.
- 2 O. Delelis, K. Carayon, E. Guiot, H. Leh, P. Tauc, J-C. Brochon, J-F. Mouscadet and E. Deprez, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 27838.
- 3 F. Y. Zeng, J. Cui, L. Liu and T. Chen, *Cancer Lett.*, 2009, **284**, 157.

II- Utilisation des triphénylaminés pour imager et déclencher l'apoptose sous excitation 2-photon

La lumière UV-visible présente une limitation majeure pour la PDT due à sa faible pénétration tissulaire ; il existe donc un réel besoin de composés organiques dont l'activation est compatible avec une excitation située dans le proche infrarouge. L'étude précédente a montré la capacité des TPAs à induire et imager la mort cellulaire sous excitation 1-photon. Néanmoins, les TPAs ont été conçues pour avoir une bonne absorption en 2-photon. Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'induction de la mort cellulaire par la photo-activation de TP2Py et TP3Bzim sous excitation 2-photon à des longueurs d'onde comprises entre 760 nm et 860 nm. En effet, de la même manière que décrite sous excitation par la lumière visible, les TPAs sous excitation 2-photon se délocalisent du cytoplasme, se relocalisent dans le noyau et induisent, de manière simultanée, la formation de bourgeonnements membranaires. Les TPAs représentent donc une nouvelle classe de photosensibilisateurs organiques solubles compatibles avec une excitation directe à 2-photon, permettant d'imager la mort cellulaire.

De plus, des expériences réalisées par cytométrie en flux, à l'aide du double marquage Annexine V/DAPI, ont permis de quantifier et de différencier les cellules en apoptose précoce ou en apoptose tardive/nécrose, après traitement par les TPAs. Ces expériences ont également permis de suivre la cinétique d'évolution de ces populations cellulaires. Ce test a confirmé l'induction de l'apoptose précoce par la photo-activation de TP2Py et TP3Bzim. Cependant, l'évolution de la mort cellulaire diffère selon la molécule. Sous excitation lumineuse, TP3Bzim induit une apoptose précoce qui augmente au cours du temps, alors que TP2Py induit initialement une apoptose précoce, qui diminue en faveur d'une augmentation de l'apoptose tardive/nécrose, à des temps d'observations plus longs. Ces différences d'évolution de la mort cellulaire par la photo-activation des TPAs peuvent s'expliquer par une localisation subcellulaire initiale différente. En effet, en étudiant la localisation cytoplasmique des molécules de manière plus approfondie, nous avons confirmé la localisation préférentiellement mitochondriale de TP2Py, mais TP3Bzim présente plutôt une localisation partielle dans les mitochondries et principale dans les endosomes tardifs.

Mitochondria-targeted Triphenylamine Derivatives Activatable by Two-Photon Excitation for Triggering and Imaging Cell Apoptosis

Rahima Chennoufi¹, Houcine Bougherara¹, Nathalie Gagey-Eilstein^{1,3}, Blaise Dumat², Etienne Henry^{1,4}, Frédéric Subra¹, Stéphanie Bury-Moné¹, Florence Mahuteau-Betzer², Patrick Tauc¹, Marie-Paule Teulade-Fichou^{2*} and Eric Deprez^{1*}

¹LBPA, CNRS UMR8113, IDA FR3242, ENS Cachan, Université Paris-Saclay, F-94235 Cachan, France

²Chemistry, Modeling and Imaging for Biology, UMR9187-U1196, Institut Curie, Centre universitaire, 91405 Orsay, France

³Present address: CNRS UMR8638, Université Paris-Descartes, 75006 Paris, France

⁴Present address: CNRS UMR6197 / UBO / IFREMER, 29280 Plouzane, France

*corresponding authors:

E-mail: deprez@lbpa.ens-cachan.fr; mp.teulade-fichou@curie.fr

Photodynamic therapy (PDT) leads to cell death by using a combination of a photosensitizer and an external light source for the production of lethal doses of reactive oxygen species (ROS). Since a major limitation of PDT is the poor penetration of UV-visible light in tissues, there is a strong need for organic compounds whose activation is compatible with near-infrared excitation. Triphenylamines (TPAs) are fluorescent compounds, recently shown to efficiently trigger cell death upon visible light irradiation (458 nm), however outside the so-called optical/therapeutic window. Here, we report that TPAs target cytosolic organelles of living cells, mainly mitochondria, triggering a fast apoptosis upon two-photon excitation, thanks to their large two-photon absorption cross-sections in the 760-860 nm range. Direct ROS imaging in the cell context upon multiphoton excitation of TPA and flow cytometric analysis showing phosphatidylserine externalization indicate that TPA photoactivation is primarily related to the mitochondrial apoptotic pathway via ROS production, although significant differences in the time courses of cell death-related events were observed, depending on the compound. TPAs represent a new class of water-soluble organic photosensitizers compatible with direct two-photon excitation, enabling simultaneous multiphoton fluorescence imaging of cell death since a concomitant subcellular TPA re-distribution occurs in apoptotic cells.

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) leads to cell death by using a combination of a photosensitizer under light excitation for the production of lethal doses of the so-called Reactive Oxygen Species (ROS)^{1,2}. Porphyrins and chlorins, exemplified by the well-known porfimer sodium (Photofrin[®]) and Temoporfin (*meta*-tetra(hydroxyl-phenyl)chlorin, Foscan[®]), respectively, are among the most potent classes of compounds used in PDT of malignancies. Significant enhancements of PDT efficacy can be achieved using combination treatments in which the effect of a photosensitizer can be improved by another chemical compound specifically targeting and inhibiting cellular pathways, such as for instance the survivin pathway³ or the proteasome-dependent protein degradation⁴, or selectively enhancing accumulation of the PDT compound within tumor cells⁵.

Another concern for PDT improvement is related to the pathway of photosensitizer excitation. Most of the standard PDT compounds developed so far are characterized by one-photon activation wavelengths in the red part of the visible spectrum, typically in the 630-690 nm range in the so-called therapeutic window, to optimize light penetration by minimizing both light scattering and absorption at the tissue level¹. Recently, visible/near-infrared (NIR) one-photon excitation (680-700 nm) of phthalocyanine dye coupled to a monoclonal antibody was used for photoimmunotherapy⁶. However, the use of NIR light for direct sensitization in PDT remains limited in the one-photon excitation mode beyond 750 nm due to insufficient energy for singlet oxygen production⁷. Recently, an alternative (indirect) approach was developed based on up-converting (NIR-to-visible) nanoparticles loaded with standard PDT compounds activatable by visible light leading to ROS formation under NIR irradiation at 980 nm⁸. The up-conversion of NIR light by endogenous biomolecules (*e.g.* 2nd harmonic generation) was also used for the one-photon activation of chlorin e6⁹. Consequently, there is a need for compounds whose activation occurs directly at wavelengths with optimal tissue penetration, typically in the NIR region of the spectrum (750-950 nm). This two-photon therapeutic window ensures a deeper penetration of light in tissue. Outside this range, visible light is strongly scattered or absorbed by redox co-factors or endogenous proteins, mainly hemoproteins, while NIR light absorption by water is high above 950 nm. Besides the deeper penetration, two-photon PDT could lead

to a higher degree of spatial selectivity due to the quadratic dependence of excitation probability on light intensity. Current PDT compounds are poorly compatible with two-photon excitation. For instance, photofrin[®] or Visudyne[®] may induce cell death but requires very high light doses (6300-11300 J/cm² and 1700 J/cm², respectively) due to a low two-photon absorption cross-section (σ^2)^{10,11}. Further progress have been achieved with porphyrin derivatives and porphyrin dimers characterized by higher σ^2 values^{12,13} or porphyrin core covalently linked to bis(diphenylamino)distyrylbenzene groups that display suitable two-photon absorption properties⁷. An indirect approach involves either energy transfer-mediated activation of a standard (one-photon) PDT compound (acceptor) by a two-photon absorbing dye acting as a donor within the same nanoparticle¹⁴ or a plasmon-mediated enhancement of two-photon excitation of the photosensitizer (*e.g.* the case of porphyrin in gold nanoparticles)¹⁵.

Based on the above-mentioned considerations, there is a great demand for new small organic PDT compounds compatible with direct two-photon excitation, characterized by easy synthesis, high chemical stability and satisfying the criteria of biocompatibility¹⁶. The triphenylamine compounds (TPA) have 2 or 3 vinyl branches with pyridinium (Py) or N-methyl benzimidazolium (Bzim) groups^{17,18}. They were initially designed for nonlinear (two-photon) absorption due to their octupolar organization and display high chemical- and photo-stability as well as good water solubility and cellular uptake¹⁷⁻¹⁹. They bind to the DNA minor groove and their binding leads to a dramatic enhancement of the fluorescence signal with a maximum emission wavelength comprised between 555 and 685 nm, depending on the compound¹⁷⁻¹⁹. Accordingly, TPA-treated fixed cells display nuclear staining with excellent contrast, using one- or two-photon microscopy¹⁷⁻²⁰. Recently, we have shown that fate and behaviour of TPAs were dramatically different in living cells²⁰. They did not directly reach the nucleus but remained localized in the cytoplasm of living cells until photoexcitation. Upon visible light irradiation (450 nm), TPAs escaped from the cytoplasm and rapidly re-localized to the nucleus. Concomitant with this translocation, TPAs were able to induce rapid and massive cell death of cells in the submicromolar/low micromolar concentration range. Conversely, without an external/artificial source of excitation, TPAs remained in cytoplasm and displayed negligible dark or daylight cytotoxicities below 30 μ M. Although TPAs display interesting properties in living cells,

their photoactivation in the visible region of the spectrum requires wavelengths (< 510 nm) far from the therapeutic window. We have previously demonstrated that TPAs are suitable for two-photon imaging of fixed cell nuclei^{18,19}, however the effect of their two-photon excitation using NIR light was never addressed in the context of living cells and is of particular interest for therapeutic applications. Here, we address the question whether the overall process (nuclear translocation and cell death) could be compatible with two-photon excitation, taking into account the good two-photon absorption cross-sections of TPAs with σ^2 values comprised between 250 and 1080 GM ($1\text{GM} = 10^{-50}\text{cm}^4\cdot\text{s}\cdot\text{photon}^{-1}\cdot\text{molecule}^{-1}$)¹⁷⁻¹⁹. For the first time, we found that TP2Py and TP3Bzim were both compatible with photo-induced cell death via a two-photon excitation process and simultaneous multiphoton imaging of cell death. We also addressed in this study the mechanism of cell death involved upon photoactivation of TPAs in relationship with their initial subcellular localization. TPAs primarily trigger the mitochondrial apoptotic pathway even though a more in-depth temporal study of TP2Py/TP3Bzim, in terms of target organelles and cell death mechanism (apoptosis versus necrosis), indicates that subtle differences exist regarding their respective subcellular fates and photo-induced effects.

RESULTS

The characteristic λ_{abs} , λ_{em} and σ^2 values for TP2Py and TP3Bzim, two members of the TPA family (2- and 3-branch compounds, respectively) and used throughout the present study, are reported in Fig. 1a. The DNA-binding properties of TPAs combined to their large two-photon absorption cross-sections were initially considered as promising for multiphoton fluorescence imaging of the nucleus. Accordingly, when fixed using paraformaldehyde, TPA-treated cells such as MCF7 (breast cancer) or HeLa (cervical cancer) clearly showed a nuclear localization of TPAs with bright staining in two-photon imaging (Fig. 1b). This is in accordance with previous results obtained using fixed MCF7 or HeLa cells studied by one-photon microscopy²⁰ or using fixed MRC5 cells studied by multiphoton microscopy^{18,19}.

Analysis of the cytoplasm-nucleus translocation of TPAs and concomitant cell death upon two-photon excitation. We next investigated the effect of two-photon excitation of TPAs in living cells.

Living MCF7 cells pre-treated with TPAs were exposed to NIR excitation and simultaneously observed under multiphoton microscopy (Fig. 2a-c). The subcellular localization of TPAs in living MCF7 cells was exclusively cytoplasmic at early times of observation. Two-photon excitation using NIR light triggered cytoplasm→nucleus translocations of both TP3Bzim and TP2Py compounds (Fig. 2a and Fig. 2b, respectively). This effect parallels, at least qualitatively, the one previously observed using visible light irradiation at 458 nm²⁰. Two-photon excitation led to re-localization of TPAs into the nucleus, after 6 min of illumination for TP3Bzim (Supplementary Table S1) and 10 min for TP2Py (Supplementary Table S2), corresponding to light doses of 450 and 750 J.cm⁻² for TP3Bzim and TP2Py, respectively. Blebbing phenomenon as well as cell shrinkage, morphological hallmarks of cell apoptosis, were consistently observed in the transmission mode. Note that plasma membrane blebs were also occasionally directly observed in fluorescence images as shown in Fig. 2c. Based on several criteria such as the beginning of nuclear translocation and the detection of blebs, the effects of TP2Py and TP3Bzim were found to be optimal using $\lambda_{\text{exc}} = 860$ and 760 nm, respectively (Supplementary Tables S1-S2), consistent with their respective maximum two-photon absorption wavelengths (Fig. 1a). The higher overall efficiency of TP3Bzim over TP2Py is most likely explained by its higher two-photon absorption cross section (Fig. 1a). Therefore, two-photon excitation induces a fast re-localization process of TPAs and concomitant cell death as previously found using one-photon excitation²⁰.

Insight into the initial localization of TPAs in the cytoplasm. Before nuclear translocation upon light illumination, TPAs were initially located in the cytoplasm. A previous analysis of emission spectra in the cellular context suggested that TPAs were not freely-diffusing compounds in the cytoplasm but most likely were sequestered in organelles and, accordingly, we found that at least mitochondria were targets for TP2Py and TP3Bzim²⁰. A more systematic characterization of the subcellular localization of TPAs was performed in the present study using a wide range of organelle trackers. Colocalization experiments were then carried out using living cells only, since fixed cells displayed an exclusive nuclear localization of TPAs. For lysosome or mitochondria staining, we used standard commercial LysoTracker or MitoTracker dyes, respectively (green or red, depending on the

TPA compound studied) whereas we used three original fusion constructs for colocalization experiments with the endoplasmic reticulum (ER), the Golgi apparatus and late endosomes: the fluorescent Cerulean protein was expressed as a fusion to a ER-peptide targeting sequence or as a fusion to small GTPase Rab6/7 proteins, associated with the Golgi apparatus or the late endosomes, respectively (see Methods for more details). As shown in Fig. 3a, TP2Py strongly colocalized with mitochondria. TP3Bzim also colocalized with mitochondria, however to a lesser extent than TP2Py (Fig. 3b). In the case of TB3Bzim, most of the colocalization signal originated from late endosomes whereas only a weak localization of TP2Py was detected within late endosomes. TP2Py/TP3Bzim did not colocalize with the ER, lysosomes or the Golgi apparatus.

Evidence for an apoptosis-mediated mechanism of cell death induced by TPAs and differential effects of TP2Py and TP3Bzim. The colocalization experiments suggest a relationship between the photocytotoxic effects of TPAs and their common initial mitochondrial localization. Accordingly, we previously shown that photoactivation of TPAs led to the cleavage of the nuclear DNA repair enzyme PARP-1 (poly-ADP ribose polymerase), a target of caspases 3/7, suggesting a cell death mechanism which mainly relies on the caspase-dependent apoptotic pathway²⁰. However, the difference in terms of subcellular distributions of TPAs (mitochondria vs late endosomes), as shown above, could be suggestive of divergent mechanisms. To gain deeper insight into the origin and the mechanism of cell death (apoptosis vs necrosis), we measured the effects of irradiated TPAs by the Annexin V assay which probes the externalization of phosphatidylserine at the plasma membrane level²¹. As both apoptotic and necrotic (or late apoptotic) cells lead to Annexin V staining, 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) staining of the nucleus was used simultaneously to distinguish between these two cell subpopulations. DAPI does not permeate cells with intact membranes when used at low concentration (<5 μ M) and thus allows identification of necrotic/late apoptotic cells only. Taking into account that TPAs are also DNA binders that stain the nucleus during the cell death process, we first demonstrated that nuclear staining by DAPI and TPAs was not mutually exclusive (Fig. 4).

Non-adherent Jurkat cells were then treated with TPAs, light-exposed and further incubated for various times in the dark before Annexin V/DAPI treatment and flow cytometric analysis (Fig. 5;

see also Supplementary Fig. 1 for complete 2-D dot plots). The population of dead cells (Annexin V⁺/DAPI⁺) continuously increased after initial light exposure and the overall time course of cell death was light dose-dependent. Again, TP3Bzim led to faster kinetics of cell death than TP2Py, in agreement with previous results on PARP-1 cleavage²⁰. In the absence of TPA or in the presence of TPA without light exposure, the population of dead cells was low and constant over time with the percentage of each subpopulation (Annexin V⁺/DAPI⁺ and Annexin V⁺/DAPI⁻) remaining unchanged over time. Under the condition of TP2Py treatment and after 30 min of light illumination, the dead cell population was mainly explained by apoptotic cells (Annexin V⁺/DAPI⁻). The other subpopulation (Annexin V⁺/DAPI⁺) remained low and constant up to 6h post-illumination. A small but significant increase of this subpopulation occurred at 8h post-illumination, suggesting that this subpopulation corresponds to necrotic/late apoptotic cells. Using higher light dose conditions (60 min of light illumination), the appearance of the Annexin V⁺/DAPI⁺ subpopulation was significantly faster. However, the appearance of Annexin V⁺/DAPI⁻ cells (apoptotic) consistently and chronologically preceded the appearance of Annexin V⁺/DAPI⁺ cells (necrotic/late apoptotic). At 8h post-illumination, the latter subpopulation was more represented than the former. TP3Bzim behave similarly to TP2Py under low illumination conditions (30 min). However, the appearance of the Annexin V⁺/DAPI⁺ subpopulation was significantly delayed with TP3Bzim compared to TP2Py under high illumination conditions (60 min), despite the overall faster kinetics of cell death, suggesting that TP2Py and TP3Bzim share a common apoptosis pathway but TP2Py also induces a proper necrosis process. Taken together, our results suggest that both TPAs primarily induce apoptosis under light illumination. Notably, our data also show a differential effect of TP2Py/TP3Bzim on the necrotic/late apoptotic subpopulation that may be due to their different subcellular localization profiles.

Participation of ROS in TPA-mediated apoptosis upon two-photon photoactivation. We next addressed the question of whether the two-photon excitation process of TPAs in the cell context leads to a significant ROS production in a similar manner to that observed using visible light irradiation²⁰. We used the ROS detector 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) which is converted into the highly fluorescent form DCF in the presence of ROS and directly measured the effect of the

concerted action of TPA and light irradiation on ROS production in fluorescence microscopy imaging. As shown in Fig. 6, two-photon ($\lambda_{\text{exc}} = 860 \text{ nm}$) irradiation of living MCF7 cells pre-treated with TP2Py led to a specific fluorescence enhancement of DCF in the irradiated area, indicating that photoactivation of TPAs triggered a burst of intracellular concentration of ROS upon two-photon excitation. To note, TP2Py nuclear translocation was systematically associated with ROS production in selected areas (only cells characterized by ROS production also display fluorescence emission of TP2Py at the nucleus level) (Fig. 6). Together, these results indicate that the combination of TP2Py and two-photon irradiation accounts for a significant production of ROS in the cell context, consistent with the initial mitochondrial localization.

DISCUSSION

Photo-induced cell death in the presence of TPAs as well as the concomitant nuclear translocation of TPAs were found to be efficient upon two-photon excitation with optimal excitation wavelengths of 760 and 860 nm for TP3Bzim and TP2Py, respectively. TPA concentrations used for triggering and simultaneously imaging the overall process (typically in the low micromolar range) are much below the intrinsic toxic concentrations, *i.e.* dark or daylight toxicities ($> 30 \mu\text{M}$)²⁰, explaining why ROS production and nuclear translocation of TPAs specifically occur in selected irradiated areas.

Although two- or three-branch TPAs remain localized in the cytoplasm of living cells without affecting cell morphology until photoactivation and behave similarly upon light excitation, we showed here that the cell distribution of the two compounds before activation was not strictly identical; TP2Py fully localized in mitochondria while TP3Bzim localized in both mitochondria and late endosomes, supporting two different modes of TPA uptake: (i) active/passive transport through the plasma membrane and (ii) endocytosis. Taking into account similar intracellular fates and biological effects of TP2Py/TP3Bzim upon light illumination, it is unlikely that TP3Bzim localization in late endosomes plays a primary (direct) role in photo-induced apoptosis, but that the common mitochondrial localization of both TPAs is most likely responsible for apoptosis. However, late endosome-localized TP3Bzim could play an indirect role by being available in the cytosol after illumination, by analogy with the photochemical internalization (PCI) technology²². We have previously shown that a neutral

TPA derivative (TP3^NBzim) has no specific subcellular localization in living cells in contrast to that observed with TP2Py or TP3Bzim²⁰. Furthermore, TP3^NBzim was unable to trigger cell apoptosis under light irradiation. TP2Py/TP3Bzim belong to a class of delocalized cations, a specific feature found in a number of already identified mitochondrial carriers²³⁻²⁵. They primarily induce apoptosis upon light illumination, in accordance with their initial mitochondrial localization. This is also consistent with the fact that most of the PDT compounds targeting mitochondria (or ER) induce apoptosis whereas other PDT compounds directly targeting the plasma membrane (or lysosomes) preferentially lead to necrosis²⁶. However, TP2Py and TP3Bzim display distinct temporal responses after initial illumination regarding the balance between apoptosis and late apoptosis/necrosis. Alternatively, the difference in subcellular localization profiles of TP2Py/TP3Bzim could account for the observed delay in the appearance of late apoptotic/necrotic cells in the case of TP3Bzim although the mechanism behind remains unclear. Importantly, this delay cannot be simply explained by differences in spectral properties of TP2Py and TP3Bzim. Indeed, such differences most likely account for the overall faster kinetics of cell death observed with TP3Bzim compared to TP2Py (higher light absorption by TP3Bzim at ≈ 450 nm in the one-photon set-up and $\sigma^2_{\text{TP3Bzim}} > \sigma^2_{\text{TP2Py}}$ in two-photon experiments). The appearance of late apoptotic/necrotic cells which occurs faster with TP2Py, suggests that the time courses of biochemical events leading to cell death intrinsically differ for the two TPA compounds.

Two-photon photoactivation of TPAs led to ROS formation as measured directly by DCF fluorescence in the cell context. Most likely, TPAs account for initial ROS production via type-1 (H_2O_2 , O_2^\cdot , $\cdot\text{OH}$) and/or type-2 ($^1\text{O}_2$) photochemical reactions in a manner similar to that of conventional PDT compounds^{26,27}. Highly fluorescent molecules have generally low singlet oxygen quantum yields. Accordingly, this quantum yield was ≈ 0.04 for TP3Bzim (measured in DMF). However, the initial and common mitochondrial localization for TP2Py/TP3Bzim suggest that ROS production is amplified at the mitochondrial level, a consequence of mitochondrial permeability transition, to reach toxic concentrations²⁸. Accordingly, the mitochondrial localization appears to be preferable for efficient PDT²⁹. Moreover, the protection effect of cyclosporine A (a compound that

inhibits mitochondrial permeability transition) on the ROS production upon TPA photoactivation, reinforces this idea²⁰. Finally, mitochondrial membrane depolarization also accounts for the subcellular re-localization of TPAs (from the cytoplasm to the nucleus) and taking into account their DNA-binding properties, TPAs could lead to DNA damage, but this is probably not the primary cause of rapid cell death as observed in our study, in accordance with many other PDT compounds³⁰.

In two-photon experiments, the fluence values (minimally 188-750 J.cm⁻²; Table 1) were found to be significantly higher compared with corresponding values in one-photon experiments (typically in the 15-144 J/cm² range; Table 1). However, these values remain compatible with non-invasive illumination conditions used *in vivo* (animals and patients) and significantly below the photodamage threshold^{10,31-34}. Moreover, the laser power as measured at the entrance of the objective in our two-photon experiments was 20 mW, a value considered as standard in non-invasive *in vivo* two-photon studies³⁵⁻³⁸. In summary, TPAs act simultaneously as pro-apoptotic agents (two-photon PDT) and apoptotic tracers, thereby displaying suitable features as potential theranostic agents. Two-photon PDT is a promising approach that significantly improves the penetration depth of light in tissues and as much may contribute to establish PDT as a realistic alternative to chemotherapy/radiotherapy for cancer treatment. However, the low number of biocompatible organic compounds directly activatable by NIR light is one of the major limitations for the development of therapeutic applications of two-photon PDT. The chemical properties and photocytotoxicity profiles of TPAs, as well as their large two-photon absorption cross-sections represent important features to expand the use of two-photon PDT.

METHODS

Synthesis and reagents. Synthesis of TP2Py (4,4'-bis[(E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl]triphenylamine bis-methiodide) and TP3Bzim (2,2',2''-((1E,1'E,1''E)-(nitrilotris(benzene-4,1-diyl))tris-(ethene-2,1-diyl))tris(1,3-dimethyl-1H-benzo[d]imidazol-3-ium)iodide) were performed as previously described^{18,19}. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were purchased from Sigma-Aldrich and Invitrogen, respectively.

Spectroscopic characterization and instrument set-up for fluorescence imaging. Absorption spectra of TPAs in Tris buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 100 mM KCl) were carried out with a Uvikon spectrophotometer. Two-photon excitation and emission spectra of TPAs in Tris buffer were recorded using a home-built set-up³⁹. Briefly, a 80-MHz mode-locked Mai-Tai® Ti:Sapphire tunable laser (690-1040 nm, 100 fs laser pulse; Spectra Physics, Mountain View, California) was focused onto the sample (80 µl) placed in a quartz micro cell. The two-photon fluorescence was collected at 90 degrees and filtered by a Semrock FF01-842/SP filter to reject the residual excitation light. The fluorescence signal was focused into an optical fiber connected to a QE65000 spectrometer (Ocean Optics). The TPA concentration was 5 µM in the presence or absence of 10 µM 21-mer double-stranded DNA (U5A/B); U5A (5'-cct gct agg gat ttt cct gcc-3') and its complementary B strand were annealed according to^{40,41}.

Confocal images (colocalization experiments and imaging of H₂DCF-DA) were obtained using a SP2 confocal microscope (Leica MicroSystem) equipped with an oil immersion x63 objective (numerical aperture, 1.32) and an incubation chamber (37°C, CO₂ 5%). A continuous laser line (458 nm) was used for excitation of TPAs in the confocal mode (emission slit settings are specified in figure legends). A similar set-up was used for two-photon images except that the excitation source was a 80-MHz mode-locked Mai-Tai® Ti:Sapphire tunable laser (720-920 nm, 100 fs laser pulse; Spectra Physics, Mountain View, California) tuned to 760 or 860 nm for TP3Bzim and TP2Py, respectively. The irradiances were calculated by measuring the power at the exit of the objective using a Vega power meter (Ophir). The power measurement was performed in the x-y scan mode (image size, 512x512 pixels; field of view, 140x140 µm; scanning frequency, 800 Hz). z-stack in two-photon

microscopy corresponded to 10 slices (512x512 pixels; z-step, 1 μ m). The time scale accounting for the effective illumination/excitation time in two-photon imaging experiments was adjusted according to the z-stack to allow comparison with previously confocal data²⁰ since the multiphoton excitation process intrinsically provides optical sectioning (discrimination occurs at excitation) whereas the z-resolution in confocal microscopy is achieved by a pinhole in the emission path that eliminates out-of-focus light (no discrimination at excitation along the z-axis).

Constructions of plasmid and lentiviral shuttle vectors for colocalization experiments.

Construction of the pShooter-ER-Cerulean plasmid. Amplification of the cDNA encoding the Cerulean protein was performed from the LeGO-Cer2 plasmid⁴² by PCR using two primers, PR1 (5'-ggg tcg acg tga gca agg gc-3') and PR2 (5'-gcg gcc gcc ttg tac agc tcg-3'), introducing two restriction sites, SalI after the atg sequence and NotI before the stop codon, respectively. The PCR-product was subcloned into the pJET2.1 plasmid (CloneJET PCR cloning kit; Thermo Scientific). After digestion of the resulting plasmid (pJET-Cer-Sal/Not) by SalI/NotI, the 714-bp fragment containing the *cer* gene was ligated (Quick ligase; Biolabs) into the pShooter-ER plasmid digested by SalI/NotI to yield the pShooter-ER-Cerulean plasmid.

Construction of the lentiviral shuttle vector expressing the Cerulean-rab6 fusion gene. Firstly, amplification of the cDNA encoding the eGFP-Rab6 fusion protein was performed from the peGFPC2Rab6 plasmid (kindly provided by M-H. Kryske, LBPA, ENS Cachan, France) by PCR using two primers, PR3 (5'-gtc gac atg gtg agc aag g-3') and PR4 (5'-ggt acc tta gca gga aca gc-3'), introducing two restriction sites, SalI before the atg sequence and KpnI after the stop codon, respectively. The PCR-product was subcloned into the pJET2.1 plasmid. After digestion of the resulting plasmid (pJET-eGFP-Rab6) by SalI/KpnI, the 1383-bp fragment containing the *eGFP-rab6* gene was ligated into a lentiviral shuttle vector (pHR' CMV-MCS) digested by SalI/KpnI to yield the pHR'-eGFP-Rab6 vector. Secondly, the *cer* gene was substituted for the *eGFP* gene. Briefly, the cDNA encoding the Cerulean protein was amplified from the LeGO-Cer2 plasmid by PCR using two primers, PR3 and PR5 (5'-gaa ttc cct tgt aca gct cg-3'), introducing two restriction sites, SalI before the atg sequence and EcoRI before the stop codon, respectively. A cytosine base was introduced

between the *cer* gene and the EcoR1 restriction site to preserve the reading frame after the *eGFP* -> *cer* substitution. The PCR-product was subcloned into the pJET2.1 plasmid. After digestion of the resulting plasmid (pJET-Cer-Sal/Eco) by Sal1/EcoR1, the 718-bp fragment containing the *cer* gene was ligated into the pHR'-eGFP-Rab6 vector digested by Sal1/EcoR1 to yield the pHR'-Cer-Rab6 vector (an EcoR1 restriction site is present between the *eGFP* and *rab6* genes).

Construction of the lentiviral shuttle vector expressing the Cerulean-rab7 fusion gene. Amplification of the cDNA encoding the Rab7 protein was performed from the DsRed-Rab7 plasmid (Addgene plasmid 12661) by PCR using two primers, PR6 (5'-gaa ttc gta cct cta gga ag-3') and PR7 (5'-ggg acc tca gca act gca g-3'), introducing two restriction sites, EcoR1 after the atg sequence and Kpn1 after the stop codon, respectively. Two bases (gt) were introduced between the EcoR1 restriction site and the *rab7* gene to preserve the reading frame after the *rab6* -> *rab7* substitution. The PCR-product was subcloned into the pJET2.1 plasmid. After digestion of the resulting plasmid (pJET-Rab7) by EcoR1/Kpn1, the 623-bp fragment containing the *rab7* gene was ligated into the pHR'-Cer-Rab6 vector digested by EcoR1/Kpn1 to yield the pHR'-Cer-Rab7 vector.

Colocalization experiments. All colocalization experiments were performed on living HeLa cells using confocal microscopy (excitation/emission settings are indicated in the corresponding figure legend).

Colocalization experiments with lysosome and mitochondria. HeLa cells were pre-treated with TPA (2 μ M) for 2 hours. The cells were then washed with PBS buffer (phosphate-buffered saline, pH 7.5, Gibco®) and further incubated with either 50 nM LysoTracker® (Invitrogen) for 90 min or 20 nM MitoTracker® (Invitrogen) for 30 min, for lysosome or mitochondria staining, respectively. For TP2Py (red emission), organelle trackers characterized by green emission were used: LysoTracker® Green DND-26 and MitoTracker® Green FM. For TP3Bzim (green emission), organelle trackers characterized by red emission were used: LysoTracker® Red DND-99 and MitoTracker® Red FM.

Colocalization experiments with the endoplasmic reticulum (ER). The gene encoding the Cerulean protein (from the LeGO-Cer2 plasmid) was introduced into the pShooter-ER plasmid (Invitrogen) by PCR as mentioned above. Six days after calcium phosphate-mediated transfection of HeLa cells with

the resulting pShooter-ER-Cerulean plasmid (allowing expression of the Cerulean as a fusion to a ER-targeting sequence), cells stably expressing the Cerulean protein at the ER level were sorted using a FACSAria cell sorter (Becton-Dickinson) and further incubated with 2 μ M of either TPA for 2h before colocalization experiments.

Colocalization experiments with the Golgi apparatus and the late endosomes. For labelling the Golgi apparatus or the late endosomes, the Cerulean protein was expressed as a fusion to Rab6 or Rab7 (see above), two small GTPase proteins associated with the Golgi apparatus or the late endosomes, respectively. A lentiviral shuttle vector (pHR' CMV-MCS, Vectors) carrying a puromycin resistance gene (under the control of the LTR-5' promoter) and the *Cerulean-rab6* (or *Cerulean-rab7*) fusion gene (under the control of the CMV promoter) was used for co-transfection of HEK293T cells, together with pMDG (encoding the VSVg envelope protein) and p8.74 (encoding the Gag-Pol proteins). The resulting viruses (obtained by trans-complementation) were used for the infection of HeLa cells in the presence of 5 μ g/ml puromycin. The selected cells were then incubated with 2 μ M of either TPA for 2h before colocalization experiments.

Annexin V/DAPI staining. Non-adherent Jurkat cells were plated in 12-well plates (10^6 cells/well), pre-incubated with 2 μ M TP2Py or TP3Bzim for 2h in the dark at 37°C and subjected to light illumination for either 30 or 60 min at 17 mW.cm⁻² (Mercury lamp (130 W; 380-600 nm) + excitation filter centered at 452 nm (\pm 45nm); total illuminated surface: 3.8 cm² (equiv. 1 well)). After light exposure, the cells were either immediately (t=0) treated for Annexin V/DAPI staining or further incubated for various times (up to t = 8h) in the dark at 37°C before Annexin V/DAPI treatment (Annexin V-FITC or Annexin V-Cy5 were used for experiments in the presence of TP2Py or TP3Bzim, respectively). Briefly, the cells were washed in ice-cold PBS 1X (Gibco®) and stained according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences); the cell pellet was re-suspended in 100 μ l Annexin V-HEPES solution (Annexin V diluted in the binding buffer: 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) and incubated for 20 min in the dark at room temperature. After addition of 400 μ l of binding buffer containing DAPI (200 nM), the cells were further incubated for 10 min. Cells were then counted by flow cytometry (FACSCantoII flow cytometer; Becton-Dickinson).

The laser/detection channels for fluorescence were 405-B for DAPI (exc: 405 nm, em: 450 ± 25 nm), 488-E for Annexin V-FITC and TP3Bzim (exc: 488 nm, em: 530 ± 15 nm), 488-D for TP2Py (exc: 488 nm, em: 585 ± 20 nm) and 633-C for Annexin V-Cy5 (exc: 633 nm, em: 660 ± 10 nm).

Fluorescence detection of ROS generation. Direct ROS detection in fluorescence imaging experiments was performed with H₂DCF-DA as explained in the corresponding figure legend. Two-photon excitation and fluorescence imaging of TP2Py was performed using a tunable pulsed laser source (λ_{exc} = 860 nm; emission slit setting: 560-720 nm) whereas a continuous laser line (488 nm) was used for excitation and imaging of DCF (emission slit setting: 500-530 nm).

REFERENCES

1. Dolmans, D. E., Fukumura, D. & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 380-387 (2003).
2. Lim, C. K. *et al.* Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. *Cancer Lett.* **334**, 176-187 (2013).
3. Ferrario, A., Rucker, N., Wong, S., Luna, M. and Gomer, C. J. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family, is induced by photodynamic therapy and is a target for improving treatment response. *Cancer Res.* **67**, 4989-4995 (2007).
4. Szokalska, A. *et al.* Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Cancer Res.* **69**, 4235-4243 (2009).
5. Anand, S., Wilson, C., Hasan, T., Maytin, E. V. Vitamin D3 enhances the apoptotic response of epithelial tumors to Aminolevulinate-based photodynamic therapy. *Cancer Res.* **71**, 6040-6050 (2011).
6. Nakajima, T., Sano, K., Mitsunaga, M., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. Real-time monitoring of in vivo acute necrotic cancer cell death induced by near infrared photoimmunotherapy using fluorescence lifetime imaging. *Cancer Res.* **72**, 4622-4628 (2012).
7. Starkey, J. R. *et al.* New two-photon activated photodynamic therapy sensitizers induce xenograft tumor regressions after near-IR laser treatment through the body of the host mouse. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6564-6573 (2008).
8. Idris, N. M. *et al.* In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. *Nat. Med.* **18**, 1580-1585 (2012).
9. Kachynski, A. V. *et al.* Photodynamic therapy by in situ nonlinear photon conversion. *Nature Photon.* **8**, 455-461 (2014).
10. Karotki, A., Khurana, M., Lepock, J. R. & Wilson, B. C. Simultaneous two-photon excitation of photofrin in relation to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **82**, 443-452 (2006).
11. Khurana, M. *et al.* Quantitative in vitro demonstration of two-photon photodynamic therapy using Photofrin® and Visudyne®. *Photochem. Photobiol.* **83**, 1441-1448 (2007).
12. Gao, D., Agayan, R. R., Xu, H., Philbert, M.A. & Kopelman, R. Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells. *Nano Lett.* **6**, 2383-2386 (2006).

13. Dahlstedt, E. *et al.* One- and two-photon activated phototoxicity of conjugated porphyrin dimers with high two-photon absorption cross sections. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 897-904 (2009).
14. Kim, S., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Pandey, R. K. & Prasad, P. N. Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2669-2675 (2007).
15. Zhao, T. *et al.* Gold nanorod enhanced two-photon excitation fluorescence of photosensitizers for two-photon imaging and photodynamic therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 2700-2708 (2014).
16. Gallavardin, T. *et al.* An improved singlet oxygen sensitizer with two-photon absorption and emission in the biological transparency window as a result of ground state symmetry-breaking. *Chem. Commun.* **48**, 1689-1691 (2012).
17. Allain, C. *et al.* Vinyl-pyridinium triphenylamines: novel far-red emitters with high photostability and two-photon absorption properties for staining DNA. *Chembiochem.* **8**, 424-433 (2007).
18. Dumat, B. *et al.* DNA switches on the two-photon efficiency of an ultrabright triphenylamine fluorescent probe specific of AT regions. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12697-12706 (2013).
19. Dumat, B. *et al.* Vinyl-triphenylamine dyes, a new family of switchable fluorescent probes for targeted two-photon cellular imaging: from DNA to protein labeling. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6054-6061 (2012).
20. Chennoufi, R. *et al.* Differential behaviour of cationic triphenylamine derivatives in fixed and living cells. *Chem. Commun.* DOI:10.1039/c5cc05970d (2015).
21. Kuznetsov, G. *et al.* Induction of morphological and biochemical apoptosis following prolonged mitotic blockage by halichondrin B macrocyclic ketone analog E7389. *Cancer Res.* **64**, 5760-5766 (2004).
22. Berg, K. *et al.* Photochemical internalization: a new tool for gene and oligonucleotide delivery. *Top. Curr. Chem.* **296**, 251-281 (2010).
23. Engelmann, F. M. *et al.* Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 175-185 (2007).
24. Magut, P. K. *et al.* Tunable cytotoxicity of rhodamine 6G via anion variations. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 15873-15879 (2013).
25. Yousif, L. F., Stewart, K. L. & Kelley, S. O. Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications. *Chembiochem.* **10**, 1939-1950 (2009).
26. Buytaert, E., Dewaele, M. & Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1776**, 86-107 (2007).
27. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. & Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med. Sci.* **24**, 259-268 (2009).
28. Circu, M. L. & Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 749-762 (2010).
29. Oliveira, C. S., Turchiello, R., Kowaltowski, A. J., Indig, G. L. & Baptista, M. S. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 824-833 (2011).
30. Robertson, C. A., Evans, D. H. & Abrahamse, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J. Photochem. Photobiol. B* **96**, 1-8 (2009).
31. Brown, S. B., Brown, E. A. & Walker, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**, 497-508 (2004).

32. Moore, C. M., Pendse, D. & Emberton, M. Photodynamic therapy for prostate cancer--a review of current status and future promise. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **6**, 18-30 (2009).
33. Moisenovich, M. M. *et al.* Novel photosensitizers trigger rapid death of malignant human cells and rodent tumor transplants via lipid photodamage and membrane permeabilization. *PLoS One* **5**, e12717 (2010).
34. Usuda, J. *et al.* Outcome of photodynamic therapy using NPe6 for bronchogenic carcinomas in central airways >1.0 cm in diameter. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2198-2204 (2010).
35. Sacconi, L., Dombeck, D. A. & Webb, W. W. Overcoming photodamage in second-harmonic generation microscopy: real-time optical recording of neuronal action potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 3124-3129 (2006).
36. Kobat, D. *et al.* Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Opt. Express* **17**, 13354-13364 (2009).
37. Wang, B. G., Konig, K. & Halbhauer, K. J. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research. *J. Microsc.* **238**, 1-20 (2010).
38. Steven, P., Bock, F., Huttmann, G. & Cursiefen, C. Intravital two-photon microscopy of immune cell dynamics in corneal lymphatic vessels. *PLoS One* **6**, e26253 (2011).
39. Li, Y. *et al.* Rational design of a fluorescent NADPH derivative imaging constitutive nitric-oxide synthases upon two-photon excitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**, 12526-12531 (2012).
40. Delelis, O. *et al.* Insight into the integrase-DNA recognition mechanism. A specific DNA-binding mode revealed by an enzymatically labeled integrase. *J. Biol. Chem.* **283**, 27838-27849 (2008).
41. Carayon, K. *et al.* A cooperative and specific DNA-binding mode of HIV-1 integrase depends on the nature of the metallic cofactor and involves the zinc-containing N-terminal domain. *Nucleic Acids Res.* **38**, 3692-3708 (2010).
42. Weber, K. *et al.* RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nat. Med.* **17**, 504-509 (2011).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche [07-PCVI-0005] and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). The authors wish to thank Prof. Boris Fehse (University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany) for providing the LeGO-Cer2 plasmid.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.M-B., M-P.T-F., P.T. and E.D. conceived and designed the study. M-P.T-F. and E.D. wrote the paper. B.D. and F.M-B. carried out the syntheses and characterizations of the compounds. F.S. and S.B-M. designed and performed the plasmid constructs. R.C., H.B., N.G-E. and E.H. performed the cytometry, imaging and two-photon experiments.

ADDITIONAL INFORMATION:

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Structures, optical properties (a) and subcellular localization of TPAs in fixed cells (b).

Two-photon imaging was performed with fixed MCF7 (left) or HeLa (right) cells treated with TP2Py (top) or TP3Bzim (bottom). Cells were first pre-incubated with 2 μ M TPA for 2h and then fixed with 4% paraformaldehyde. The emission slit settings for two-photon imaging was 560-720 nm and 530-690 nm for TP2Py and TP3Bzim, respectively. Insets: corresponding DIC (differential interference contrast) transmission images.

Figure 2: Death of MCF7 cells induced by two-photon excitation of TPAs. Living MCF7 cells pre-treated with TP3Bzim (a) or TP2Py (b) were exposed to two-photon illumination using a pulsed IR laser as an excitation source (irradiance, 1.25 W.cm⁻²). λ_{exc} = 760 and 860 nm for TP3Bzim (emission slit: 530-690 nm) and TP2Py (emission slit: 560-720 nm), respectively. Left, initial observation (t=0). Right, observation after an illumination time of 7 min (TP3Bzim) or 20 min (TP2Py). Corresponding DIC transmission images illustrating membrane blebbing (blue arrows) are shown below fluorescence images. The time of illumination was calculated by taking into consideration the z-stack as indicated in Methods. c, Two-photon fluorescence images showing the time-dependent re-localization of TP2Py (cytoplasm -> nucleus) as well as the formation of blebs (blue arrows) upon excitation at 860 nm (bottom: DIC transmission image).

Figure 3: Subcellular localization of TPAs before light-induced nuclear translocation. Colocalization experiments were performed using living HeLa cells, treated with 2 μ M TP2Py (a) or TP3Bzim (b) and further observed using confocal microscopy. Due to its well-marked emission in the red region of the spectrum, the subcellular localization of TP2Py was studied using green trackers of lysosomes or mitochondria, whereas red trackers were used for TP3Bzim. Lysosome and mitochondria staining were performed using LysoTracker® Green DND-26 and MitoTracker® Green FM, respectively, in panel a (λ_{exc} = 488 nm / emission: 500-550 nm), or LysoTracker® Red DND-99 (λ_{exc} = 543 nm / emission: 600-700 nm) and MitoTracker® Red FM (λ_{exc} = 633 nm / emission: 650-700 nm), respectively, in panel b. For both TPAs, colocalization experiments with the Golgi apparatus, late

endosomes or the endoplasmic reticulum (ER) were performed using HeLa cells expressing the Cerulean protein (blue emission) fused either to the targeting-Golgi Rab6 protein, the targeting-late endosome Rab7 protein or a targeting-ER peptide, respectively ($\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$ / emission: 465-510 nm). TPA channel: $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$ / emission slit settings: 560-720 and 530-690 nm for TP2Py and TP3Bzim, respectively. Top: imaging channel of the organelle tracker; middle: imaging channel of TPA; bottom: corresponding merged images. Yellow to orange areas indicate colocalization of TPA/organelle.

Figure 4: Simultaneous labelling of nuclei by TPAs and DAPI. **a**, MCF7 cells. Before observation by confocal microscopy, MCF7 cells were fixed with 4% paraformaldehyde and treated with TPA alone (2 μM ; left), DAPI alone (200 nM; middle) or a combination of both (2 μM TPA + 200 nM DAPI; right). As already shown in Fig. 1b, TPAs were localized in nuclei under fixation conditions (top: TP2Py; bottom: TP3Bzim). TPA-staining of the nucleus did not prevent DAPI-staining of the nucleus when MCF7 cells were simultaneously treated with TPA and DAPI (right column). **b**, Jurkat cells. After treatment with DAPI alone (200 nM; left) or DAPI+TPA (200 nM DAPI; 2 μM TPA: middle and right columns for TP2Py and TP3Bzim, respectively), living Jurkat cells were subjected to illumination for 1h by using a Mercury lamp (130 W; 380-600 nm + excitation filter centered at 452 nm ($\pm 45 \text{ nm}$); irradiance, 17 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) and were further incubated for 4h in the dark before observation by confocal microscopy. Insets: DIC transmission images. No or very weak DAPI-staining of Jurkat nuclei was observed in the absence of any TPA, as expected for living cells (left column). By contrast, some of TPA-treated and illuminated cells displayed DAPI-staining of nuclei (concomitant with nuclear translocation of TPAs), demonstrating that nuclear staining of Jurkat cells by DAPI and TPA is not mutually exclusive under this experimental condition (equivalent to the condition used in flow cytometric analysis shown in Figs 5 & S1). This population of DAPI-stained cells corresponds to necrotic/late apoptotic cells (see Figs 5 & S1). Excitation and emission slit settings: channel TP2Py ($\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 560\text{-}720 \text{ nm}$); channel TP3Bzim ($\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530\text{-}690 \text{ nm}$); channel DAPI ($\lambda_{\text{exc}} = 740 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 406\text{-}506 \text{ nm}$). Incubation times were 2 h and 10 min for TPAs and DAPI, respectively.

Figure 5: TPAs induce cell apoptosis upon light illumination as revealed by Annexin V/DAPI staining. Living Jurkat cells were treated with 2 μ M TP2Py (**a**) or TP3Bzim (**b**) (as indicated in Methods) and subjected to light illumination for 30 (top) or 60 min (middle). The source of excitation was a Mercury lamp (130 W; 380-600 nm) with an excitation filter centered at 452 nm (± 45 nm) (irradiance, 17 mW.cm⁻²). The cells were then further incubated for various times in the dark at 37°C before Annexin V/DAPI treatment and flow cytometric analyses. Cell populations corresponding to apoptotic and necrotic (or late apoptotic) cells were plotted as a function of time after light exposure. Bottom: control population of TPA-treated cells without light exposure. Black squares: apoptotic cells (Annexin V⁺, DAPI⁻); white squares: necrotic/late apoptotic cells (Annexin V⁺, DAPI⁺); white circles: total number of dead cells (Annexin V⁺, DAPI^{+/+}). Error bars indicate S.D. ($n = 3$). Right: examples of 2-dimensional dot plots for $t = 8$ h (TP2Py) or 6 h (TP3Bzim) (the complete study is shown in Supplementary Fig. 1). All the cells selected for the analysis of Annexin V/DAPI staining were positive for TPA fluorescence.

Figure 6: Photoactivation of TPAs promotes ROS production: fluorescence imaging of ROS production upon two-photon excitation of TP2Py. Living MCF7 cells were pre-incubated with 2 μ M TP2Py for 2 h in the dark at 37°C and further exposed to two-photon illumination for 15 min ($\lambda_{\text{exc}} = 860$ nm; irradiance, 1.25 W.cm⁻²). Two-photon fluorescence imaging of TP2Py is presented before (top) or after (middle) 15-min illumination. The cells were then treated with 10 μ M H₂DCF-DA for 1 h and the excitation area for imaging was changed by moving the sample (the cell indicated by the red arrow serves as a landmark). Bottom: two-photon and confocal fluorescence imaging of TP2Py (left) and DCF (right), respectively. Excitation wavelengths were 860 nm and 488 nm for TP2Py (emission slit: 560-720 nm) and DCF (emission slit: 500-530 nm), respectively. The fluorescence signal of DCF accounting for ROS production was only detected in cells initially subjected to the 15-min period of light illumination (this area is delineated by a dashed line).

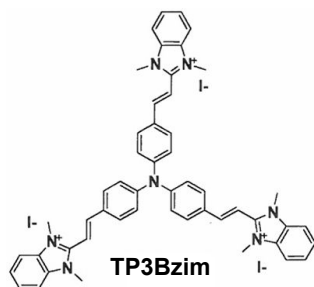
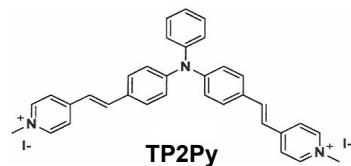
Table 1: Indicative values of fluences^a characterizing TPA compounds based on morphological and biochemical criteria.

Observable		Compound	
		TP2Py	TP3Bzim
1^b	Beginning of the nuclear translocation (epifluorescence microscopy) (1-PE)	<108 J.cm ⁻²	<108 J.cm ⁻²
2	1 st maximum of fluorescence accumulation into the nucleus (confocal microscopy)	irradiance 30 mW.cm ⁻² (1-PE)	<32-45 J.cm ⁻²
		irradiance 5.6 mW.cm ⁻² (1-PE)	<45 J.cm ⁻²
3	Appearance of blebs (confocal microscopy/transmission mode) (1-PE)	<108-144 J.cm ⁻²	<108-144 J.cm ⁻²
4	Photocytotoxicity (LT ₅₀) (1-PE)	30.6-40.8 J.cm ⁻²	15.3 J.cm ⁻²
5	PARP cleavage (1-PE)	<61.2 J.cm ⁻²	<15.3 J.cm ⁻²
6	ROS formation (TC ₅₀) (1-PE)	30.6 J.cm ⁻²	nd ^c
7	Beginning of the nuclear translocation (2-PE)	<750 J.cm ⁻²	<450 J.cm ⁻²
8	Appearance of blebs (2-PE)	<750 J.cm ⁻²	<188 J.cm ⁻²

1-PE: one-photon excitation; 2-PE: two-photon excitation. ^aFluences were calculated for a TPA concentration of 2 μM. The symbol “<” means that fluence was measured under continuous illumination and then corresponds to an upper limit value. ^b**1-6:** from ref. 20; **7-8:** Supplementary Tables S1-S2. ^cnd: not determined

Figure 1

a



			λ_{abs} (1-PE) (nm) ^a	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹) ^b	λ_{exc} (2-PE) (nm) ^a	σ^2 (GM)	$\sigma^2 \times \phi$ (GM) ^c	λ_{em} (nm)
TP2Py	buffer ^d	− DNA	473	39,900	840	nd	0.3	633
	buffer ^d	+ DNA ^e	506	31,400	860	325	26	637
TP3Bzim	buffer ^d	− DNA	433	68,900	740	nd	2	620
	buffer ^d	+ DNA ^e	457	62,400	760/840 ^f	764/250	258/85	572

^a 1-PE: one-photon excitation; 2-PE: two-photon excitation

^b ϵ : molar extinction coefficient

^c $\sigma^2 \times \Phi$: 2-photon brightness where σ^2 is the 2-photon absorption cross section and Φ the fluorescence quantum yield

^d 10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 100 mM KCl; ^e Double-stranded DNA (U5A/B; 21-mer); ^f Two excitation maxima

nd, not determined

b

Two-photon

$$\lambda_{\text{exc,TP2Py}} = 860 \text{ nm} / \lambda_{\text{exc,TP3Bzim}} = 760 \text{ nm}$$

MCF7

HeLa

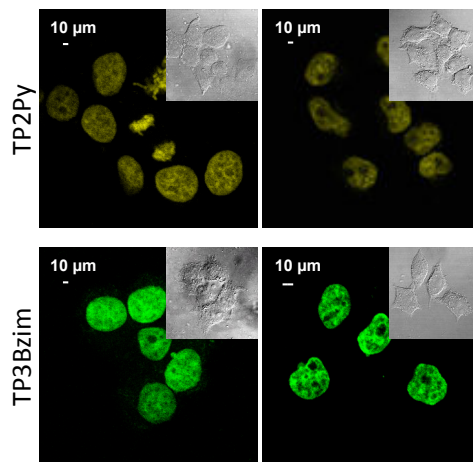


Figure 2

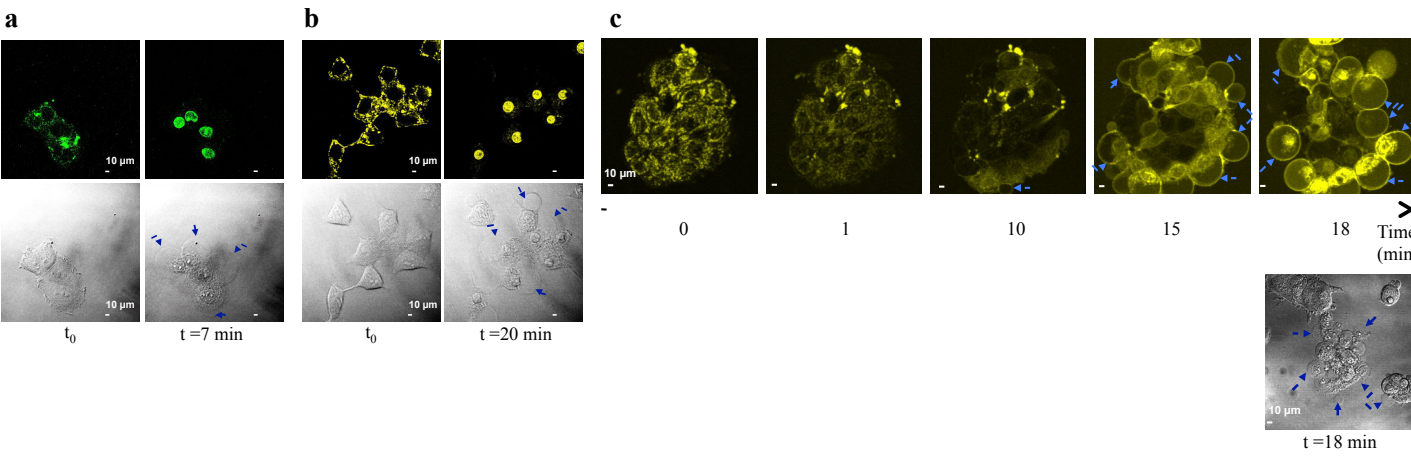


Figure 3

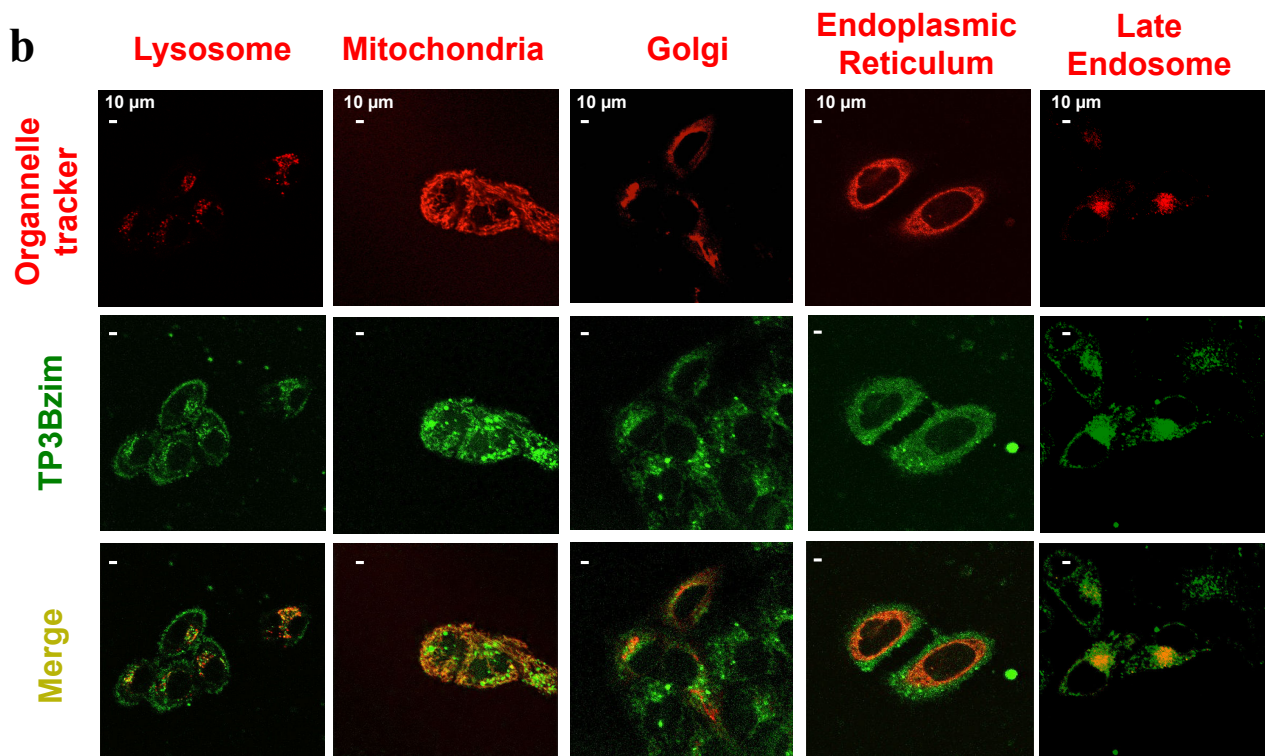
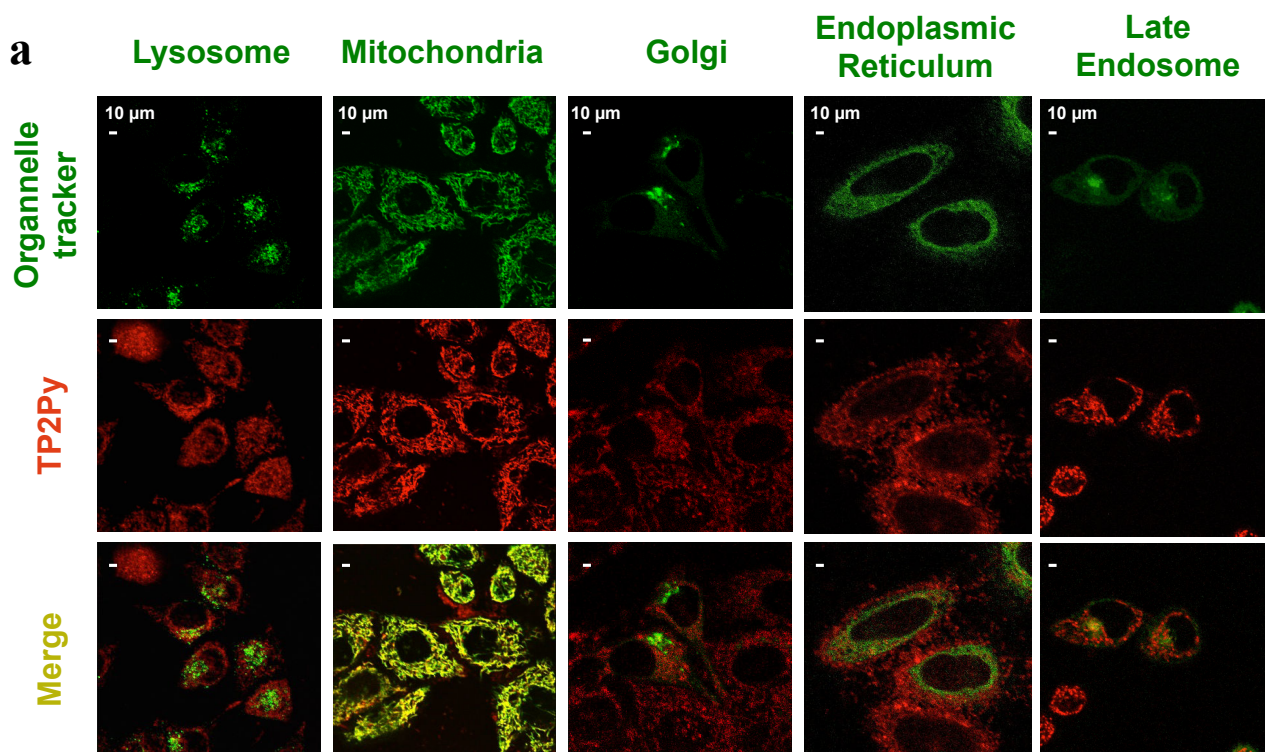


Figure 4

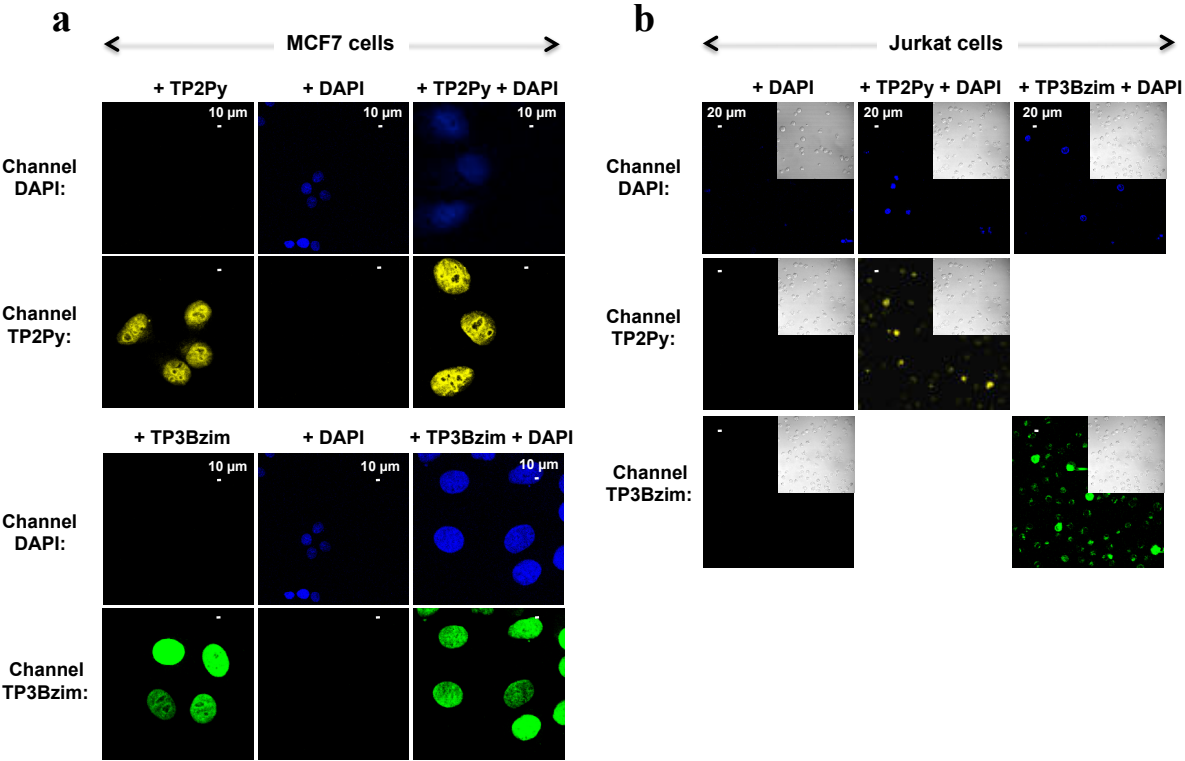


Figure 5

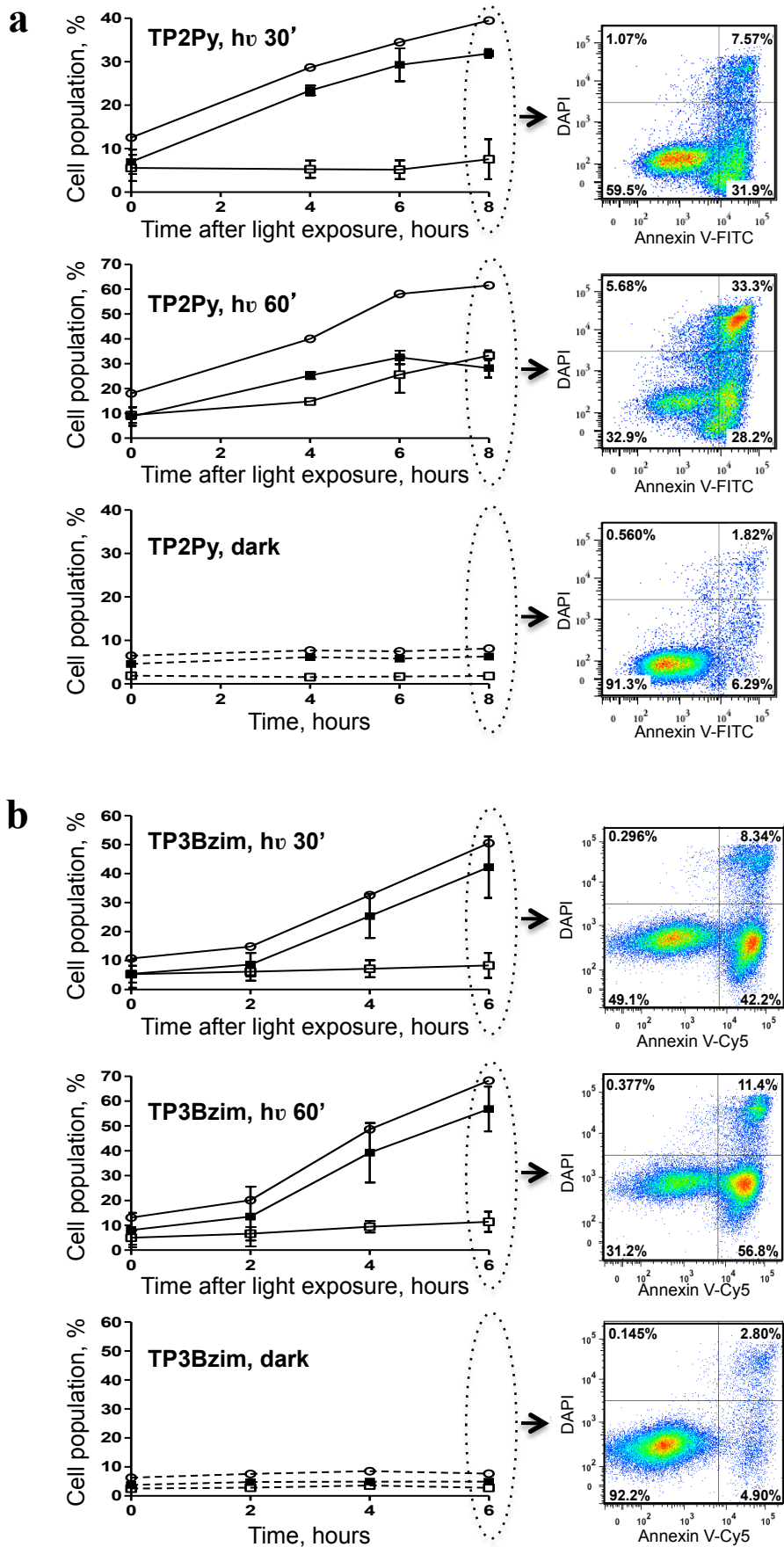
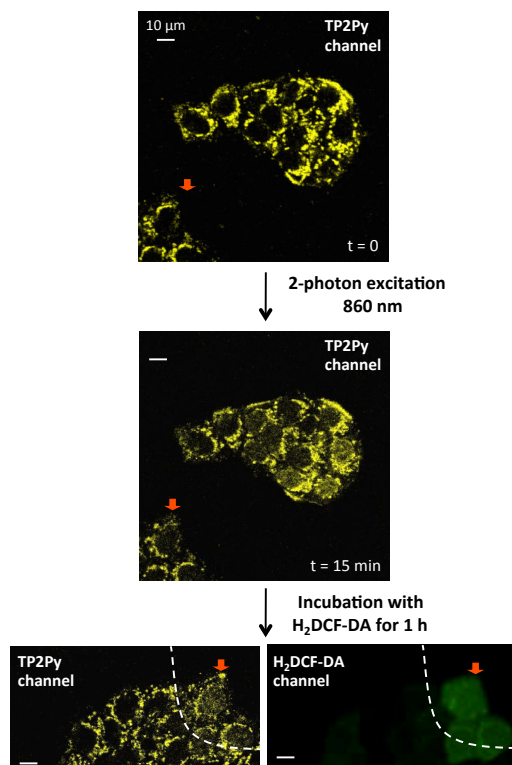


Figure 6



SUPPORTING INFORMATION

Mitochondria-targeted Triphenylamine Derivatives Activatable by Two-Photon Excitation for Triggering and Imaging Cell Apoptosis

Rahima Chennoufi¹, Houcine Bougherara¹, Nathalie Gagey-Eilstein^{1,3}, Blaise Dumat², Etienne Henry^{1,4}, Frédéric Subra¹, Stéphanie Bury-Moné¹, Florence Mahuteau-Betzer², Patrick Tauc¹, Marie-Paule Teulade-Fichou^{2*} and Eric Deprez^{1*}

¹Laboratory of Biology and Applied Pharmacology, ENS Cachan, CNRS UMR8113, IDA FR3242, F-94235 Cachan, France

²Laboratory of Chemistry, CNRS UMR176, Institut Curie, University of Orsay, Paris-Sud, 91405 Orsay, France

³Present address: CNRS UMR8638, University of Paris-Descartes, 75006 Paris, France

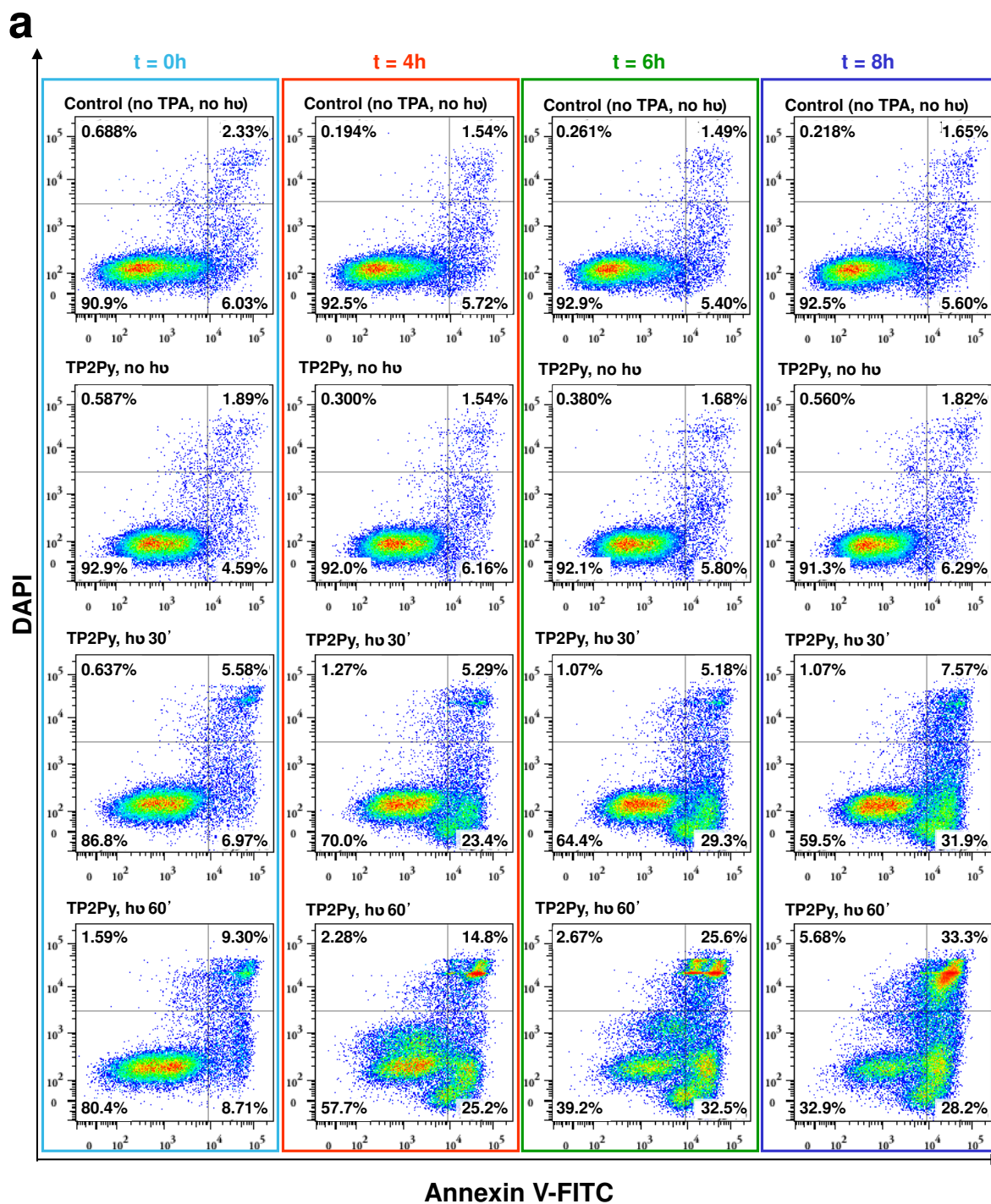
⁴Present address: CNRS UMR6197 / UBO / IFREMER, 29280 Plouzane, France

* corresponding authors:

E-mail: deprez@lbpa.ens-cachan.fr; mp.teulade-fichou@curie.fr

Table of contents:

- Figure S1a.....	page 2
- Figure S1b.....	page 3
- Table S1.....	page 4
- Table S2.....	page 4



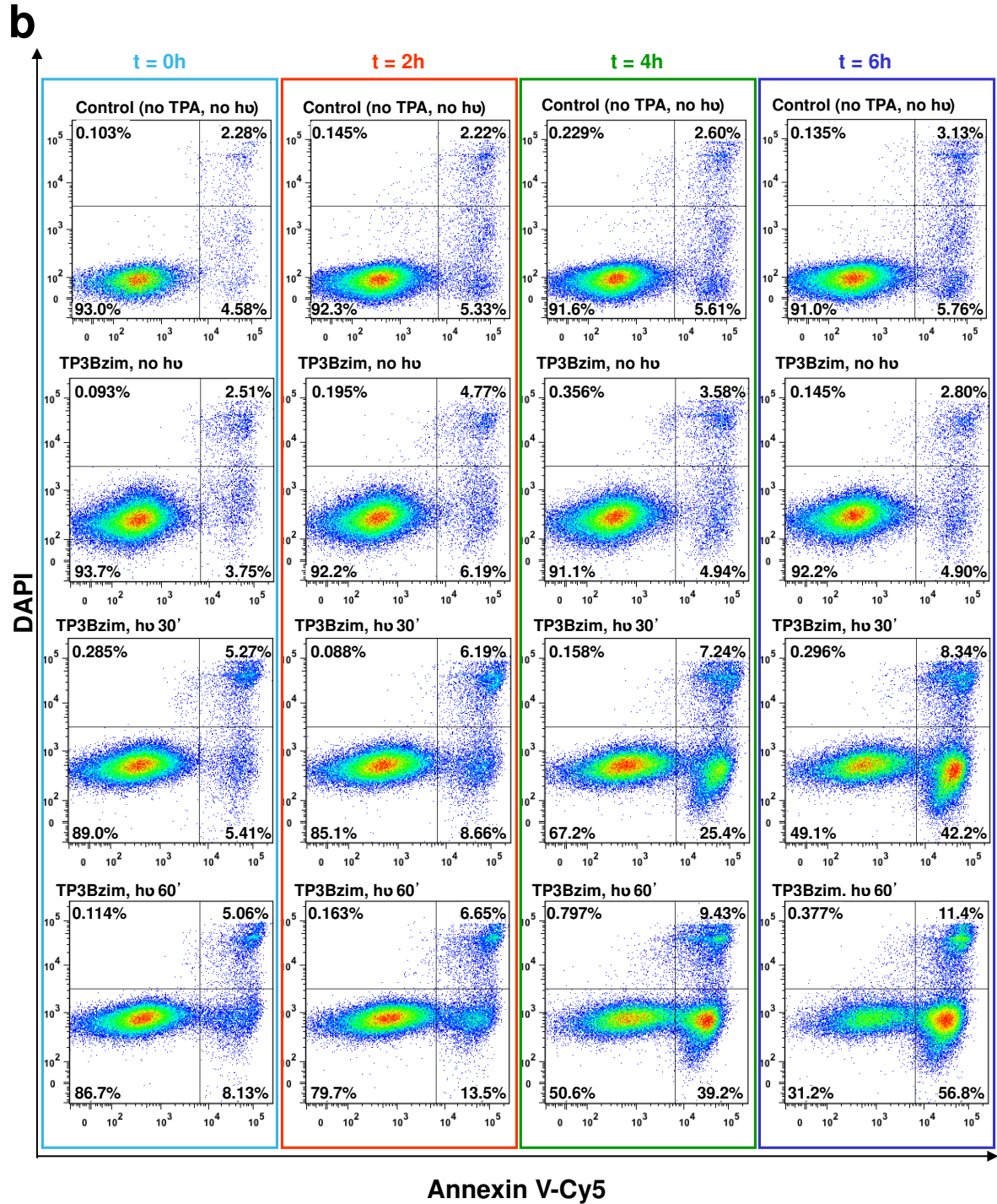


Figure S1. Flow cytometric analysis of Annexin V/DAPI staining of TPA-treated Jurkat cells. Jurkat cells were pre-incubated with 2 μ M TP2Py (a) or TP3Bzim (b) for 2h in the dark at 37°C and subjected to light illumination for either 30 min (3rd line) or 60 min (4th line) at 452 nm (17 mW/cm²). After light exposure, cells were either immediately (t=0; light blue) treated for Annexin V/DAPI staining or further incubated for various times in the dark at 37°C before Annexin V/DAPI treatment: a, t = 4h (red); t = 6h (green); t = 8h (dark blue); b, t = 2h (red); t = 4h (green); t = 6h (dark blue). 1st line: untreated control cells (without TPA, without light illumination). 2nd line: TPA-treated control cells (without light illumination). Annexin V was labelled with FITC (panel a) or Cy5 (panel b). The horizontal and vertical axes correspond to fluorescence intensities of Annexin V-FITC/Cy5 and DAPI, respectively. The 2-D dot plots shown in panels a & b are representative of three independent experiments.

Table S1: Times of illumination required for the observation of cellular events upon two-photon excitation of TP3Bzim at various wavelengths.

Two-photon excitation of TP3Bzim^a					
	740 nm	760 nm	780 nm	800 nm	820 nm
Appearance of blebs	3 min	2.5 min	3 min	5 min	10 min
Beginning of the nuclear translocation	6 min	6 min	6 min	6 min	13 min
Nuclear staining (max)	18 min	9 min	13 min	11 min	21 min

^aIrradiance: 1.25 W/cm²

Table S2: Times of illumination required for the observation of cellular events upon two-photon excitation of TP2Py at various wavelengths.

Two-photon excitation of TP2Py^a				
	840 nm	860 nm	880 nm	900 nm
Appearance of blebs	19.5 min	10 min	9 min	nd ^b
Beginning of the nuclear translocation	21 min	10 min	12 min	nd ^b
Nuclear staining (max)	34.5 min	20 min	24 min	nd ^b

^aIrradiance: 1.25 W/cm². ^bnd: not determined due to photobleaching

III- Caractérisation de la relation structure-activité des triphénylamines et de leur capacité à imager et déclencher la mort cellulaire sous excitation 1- et 2-photon

Précédemment, nous avons mis en évidence l'intérêt de l'utilisation des TPAs pour la PDT en 1-photon et surtout en 2-photon, par l'étude de deux molécules : TP2Py et TP3Bzim. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à quatre autres molécules de la famille des TPAs, différant sur leur nombre de liens vinyliques et sur la nature du groupement attracteur d'électron : TP3Py, TP2Bzim, TP2Pyo et TP3Pyo. L'objectif de cette étude a été, dans un premier temps, de confirmer l'induction de la mort cellulaire par toutes ces molécules sous excitation 1- et 2-photon. Suite aux différences observées entre TP2Py et TP3Bzim, nous avons appréhendé la relation entre la structure chimique des TPAs et leurs caractéristiques cellulaires, c'est-à-dire leur localisation subcellulaire initiale, leur capacité à photo-induire la mort cellulaire et l'évolution de la mort cellulaire (apoptose vs apoptose tardive/nécrose).

Dans les cellules vivantes, toutes les TPAs se localisent initialement dans le cytoplasme. Sous excitation 1-photon, les molécules se délocalisent vers le noyau et induisent une formation de bourgeonnements membranaires. Deux molécules semblent être moins efficaces, induisant la mort cellulaire à des temps d'illumination significativement plus longs : TP2Pyo et TP3Pyo. Ces observations sont confirmées par la cinétique d'évolution de la mort cellulaire par cytométrie en flux, où TP2Pyo et TP3Pyo présentent une très faible efficacité pour l'induction de la mort cellulaire. Ces deux molécules ayant des coefficients d'absorption similaires aux autres TPAs étudiées, nous pouvons en déduire que la nature de l'accepteur électronique influe sur la photo-réactivité des molécules. Sous excitation 2-photon, seules TP2Py, TP2Bzim et TP3Bzim ont la capacité d'induire les phénomènes de relocalisation et de mort cellulaire. La structure chimique des TPAs ne semble pas influencer leur efficacité en 2-photon. Ces observations pourraient s'expliquer par un plus fort photoblanchiment sous excitation 2-photon pour ce qui est des molécules non-actives.

Nous avons également souligné l'influence du nombre de liens vinyliques sur la localisation subcellulaire initiale des TPAs. Les TPAs possédant deux branches (TP2) présentent une localisation essentiellement mitochondriale et une localisation résiduelle dans les endosomes tardifs. Les TPAs à trois branches (TP3) sont eux préférentiellement localisées dans les endosomes tardifs, avec une localisation partielle mitochondriale pour certaines

d'entre elles (TP3Bzim et TP3Pyo). De plus, la cinétique d'évolution de la mort cellulaire observée en cytométrie en flux par le double marquage Annexine V/DAPI a révélé l'influence du nombre de liens vinyliques sur le type de mort cellulaire photo-induite. De manière générale, les TP3 induisent une mort cellulaire plus efficace que leur homologue 2-branches. Aussi, les TP3 induisent de l'apoptose précoce qui augmente au cours du temps. Les TP2 induisent initialement de l'apoptose précoce qui, à des temps d'observation plus longs, diminue au profit de l'apoptose tardive/nécrose. Ces observations suggèrent que la photo-activation des TP2 induit de l'apoptose précoce, mais aussi une part de nécrose. Nous avons donc montré une relation, au moins indirecte, entre la localisation subcellulaire initiale des TPAs (*i.e.* avant illumination continue des cellules traitées) et le type de mort cellulaire photo-induit.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, le développement de marqueurs fluorescents à forte absorption 2-photon présente un grand intérêt dans le domaine biomédical. En effet, les longueurs d'onde utilisées en 2-photon (infrarouge ou proche infrarouge) sont plus pénétrantes au niveau tissulaire, puisqu'elles sont moins diffusibles et moins absorbées par l'environnement tissulaire³⁹. Ces molécules fluorescentes présentent différentes applications. Certaines sont utilisées comme des marqueurs fluorescents, comme les marqueurs du noyau¹⁷⁷ ou les sondes chimiques¹⁷⁸. D'autres permettent d'induire un processus biologique sous excitation biphotonique, comme les protéines utilisées en opto-génétique^{179,180}, ou les molécules de la thérapie photodynamique (PDT)^{21,59}.

Dumat *et al.* ont récemment synthétisé une famille de triphénylamine (TPA) caractérisées par de bonnes sections efficaces d'absorption 2-photon (σ^2)¹⁷⁰. Ces molécules possèdent un cœur triphénylamine comportant deux (TP2) ou trois (TP3) liens vinyliques. A l'extrémité de ces branches sont greffés des groupements accepteurs d'électrons de type N-méthyl benzimidazolium (Bzim), pyridinium (Py) ou pyridinium avec un azote en position ortho (ortho-pyridine, Pyo) (Tableau 1).

En plus de leurs propriétés d'absorption non linéaire de la lumière, les TPAs ont la capacité de se fixer dans le petit sillon de l'ADN, au niveau de régions riches en AT. Leurs rendements quantiques de fluorescence augmentent aussi de façon très significative suite à cette fixation permettant ainsi le marquage du noyau de cellules fixées sous illumination 2-photon¹⁷¹.

Des études plus récentes ont aussi révélé l'intérêt de l'utilisation des TPAs pour la thérapie photodynamique (PDT), y compris par excitation 2-photon dans le proche infra-rouge¹⁸¹. En particulier, deux molécules de la famille des TPAs, TP2Py et TP3Bzim, ont montré leur capacité à déclencher et imager l'apoptose sous excitation lumineuse 1- et 2-photon. La photo-activation de ces deux molécules est à l'origine des mêmes observations et caractéristiques globales au niveau sub-cellulaire. Les molécules initialement présentes dans le cytoplasme se délocalisent vers le noyau sous excitation photonique ; en parallèle, les cellules se contractent et forment des bourgeonnements membranaires, des caractéristiques morphologiques spécifiques de l'apoptose^{25,182}. Le déclenchement de l'apoptose est médiée par une génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) initiée par la photo-activation des TPAs. Toutefois, des différences ont pu être révélées entre TP2Py et TP3Bzim, notamment concernant leur localisation sub-cellulaire ; en effet, TP2Py est pleinement mitochondriale alors que TP3Bzim est partiellement dans les mitochondries et majoritairement présente dans

les endosomes tardifs. TP2Py et TP3Bzim sont également caractérisées par des mécanismes et des cinétiques de mort cellulaire différents. Ces deux molécules induisent un mécanisme de mort cellulaire essentiellement apoptotique dans des délais courts suivant l'irradiation (quelques heures). A des temps d'observations plus longs, TP2Py semble induire un phénomène de nécrose survenant plus précocement qu'avec TP3Bzim. De plus, TP3Bzim induit une cinétique de mort cellulaire globale plus rapide que TP2Py¹⁸³.

La structure chimique de TP2Py et TP3Bzim diffèrent sur plusieurs points : le nombre de branches greffées sur le cœur triphenylamine et la nature du groupement accepteur d'électron. Dans cet article, nous avons étendu la caractérisation de la mort cellulaire et de la localisation subcellulaire à d'autres molécules de la famille des TPAs : TP3Py, TP2Bzim, TP2Pyo et TP3Pyo, afin de mettre en évidence la relation entre la structure et l'activité des TPAs. Dans un premier temps, nous avons vérifié si toutes les TPAs sont en capacité de photo-induire les phénomènes observés (mort cellulaire et translocation nucléaire concomitante) par excitation 1- (lumière visible) ou 2-photon (lumière proche infra-rouge). Dans un second temps, nous avons cherché à établir la relation entre la structure (nombre de branche et type d'accepteur électronique) et les comportements sub-cellulaires des TPAs. Pour l'essentiel, nous avons montré que le nombre de branches vinyliques influe sur la localisation sub-cellulaire des TPAs, et que cette dernière détermine le mécanisme et les cinétiques d'évènements associés à la mort cellulaire. La nature chimique du groupement attracteur d'électrons intervient dans l'efficacité des molécules ; les TP-Pyo sont nettement moins efficaces que les dérivés Bzim ou Py, quelque soit le mode d'excitation, 1- ou 2-photon.

MATERIELS ET METHODES

Réactifs :

Les TPAs ont été synthétisées par l'équipe du Dr Marie-Paule Teulade-Fichou (Institut Curie-Orsay, UMR 176)^{170,171}. Les molécules ont été conservées sous forme de poudre à -20°C. Les solutions stocks à 10 mM dans du DMSO ont été conservées à -20°C.

Les marqueurs cellulaires MitoTracker Green et Red, le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), l'AnnexinV-FITC et l'AnnexinV-Cy5 proviennent de Molecular Probes, Invitrogen. La camptothécine a été achetée chez Sigma-Aldrich. Le sérum de veau fœtal, les milieux DMEM et RPMI et la penicilline/streptomycine proviennent de GibcoBRL.

Caractéristiques spectrophysiques 1- et 2-photon :

Les caractéristiques spectrales 1- et 2-photon des TPAs ont été mesurées avec une concentration finale de 5 μ M dans un tampon Tris 10 mM, pH 7,4, KCl 100 mM. Les propriétés spectrophysiques ont été déterminées en présence ou non de 10 μ M d'ADN double brin 21-mer (ADNdb). Les oligonucléotides complémentaires utilisés pour l'hybridation de l'ADNdb sont respectivement 5'-TAT ACA AAA TTC CAT GAC AAT-3' et 5'-ATT GTC ATG GAA TTT TGT ATA-3'.

Les spectres d'absorption et d'émission ont été respectivement obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon XL (Bioserv) et d'un spectrofluorimètre Eclipse (Varian). Les mesures d'absorption 2-photon ont été réalisées à l'aide d'un montage mis en place au laboratoire, utilisant un laser accordable en mode verrouillé à 80 MHz Ti:Sapphire Mai Tai[®] (690-1040 nm, laser pulsé 100 fs ; Spectra Physics, Mountain View, CA, USA)¹⁶².

Cultures cellulaires :

Les cellules HeLa et Jurkat E6.1 ont été respectivement cultivées dans un milieu DMEM et RPMI, supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline/streptomycine. Les cellules ont été maintenues à 37°C, dans une atmosphère régulée à 5% CO₂.

Imagerie 1- et 2-photon :

Les images en mode excitation 1- et 2-photon ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal SP2 (Leica MicroSystems) équipé d'une chambre d'incubation à 37°C et 5% CO₂.

Les cellules HeLa ont étéensemencées dans des WillCo-Dish[®] à fond en verre (WillCo Wells, Amsterdam, Pays-Bas) à 6×10^4 cellules/ml dans du DMEM. Après 48h, les cellules ont été incubées avec 2 μ M de TPAs à 37°C pendant 2h. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS (*Phosphate Buffer Saline*), puis illuminées en 1-photon avec un laser Argon à 458 nm ou en 2-photon avec un laser accordable en mode verrouillé à 80 MHz Ti:Sapphire Mai Tai[®] (720-920 nm, laser pulsé 100 fs ; Spectra Physics, Mountain View, CA, USA). Les longueurs d'onde d'excitation 2-photon sont précisées dans les légendes des figures. L'émission de fluorescence a été recueillie à 530-690 nm pour TP2Bzim et à 560-720 nm pour TP3Py, TP2Pyo et TP3Pyo.

Expériences de co-localisation :

Le marquage des endosomes tardifs a été réalisé par transfection de cellules HeLa par un vecteur exprimant un gène codant pour une protéine recombinante, Rab7-cerulean, spécifiquement exprimée dans ces organites cellulaires, comme décrit précédemment¹⁸¹.

Les cellules HeLa et HeLa Rab7-cerulean ont été ensemencées dans des WillCo-Dish® à fond en verre à 6×10^4 cellules/ml. Après 48h de culture, les cellules ont été incubées avec 2 μ M de TPAs pendant 2h. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS. Les cellules HeLa Rab7-cerulean ont été directement utilisées pour l'imagerie. Les cellules HeLa ont été traitées avec différents marqueurs : 35 nM de MitoTracker Green (pour TP3Py, TP2Pyo et TP3Pyo) ou 50 nM de MitoTracker Red (pour TP2Bzim) pendant 30 minutes. Puis, les cellules HeLa ont été rincées avec du PBS avant l'imagerie.

Le MitoTracker Green a été excité à 488 nm et l'émission recueillie à 500-550 nm, le MitoTracker Red a été excité à 633 nm et l'émission recueillie à 650-700 nm ; la protéine cerulean a été excitée à 458 nm et l'émission recueillie à 465-510 nm.

Cytométrie en flux :

Les cellules Jurkat E6.1 ont été ensemencées dans une plaque 12 puits. Elles ont été ensuite incubées avec 2 μ M de TPAs pendant 2h ou 10 μ M de camptothécine pendant 5h à 13h. Les cellules traitées par les TPAs ont ensuite été lavées et illuminées pendant 30 min à l'aide d'une lampe Mercure équipée d'un filtre centré à 452 nm (\pm 45 nm). Pour chaque condition de traitement, une partie des cellules a été prélevée à différents temps et marquée à l'AnnexinV-FITC (pour TP2Py, TP3Py, TP2Pyo et TP3Pyo) ou l'AnnexinV-Cy5 (pour TP2Bzim et TP3Bzim) pendant 15 min, puis avec 250 nM de DAPI pendant 10 min. Les cellules ont été maintenues avant analyse dans une atmosphère régulée à 5% CO₂ à 37°C.

Les mesures et analyses ont été réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux FACSCanto II (Becton-Dickinson, Sunnydale, CA, USA). TP2Bzim, TP3Bzim et l'AnnexinV-FITC ont été excités à 488 nm et détectés à l'aide du filtre FITC (530/30 nm). TP2Py, TP3Py, TP2Pyo et TP3Pyo ont été excités à 488 nm et détectés à l'aide d'un filtre PE (585/42 nm). L'AnnexinV-Cy5 a été excitée à 633 nm et détectée grâce au filtre APC (660/20 nm). Le DAPI a été excité à 405 nm et la fluorescence émise a été recueillie par un filtre Pacific Blue™ (450/50 nm).

RESULTATS

Dans un premier temps, nous avons déterminé les principales caractéristiques photophysiques *in vitro* des TPAs en présence ou non d'ADN (Tableau 1). Les TPAs sont des molécules initialement conçues pour marquer l'ADN et réagissent toutes de la même manière, au moins qualitativement, à leur environnement. Les six molécules présentent de meilleures

caractéristiques d'absorption 1- et 2-photon (coefficient d'extinction molaire (ϵ) et section efficace d'absorption 2-photon (σ^2) plus élevés) lorsqu'elles sont fixées à l'ADN. De plus, les longueurs d'onde d'émission des TPAs (λ_{em}) sont plus courtes (*blue-shift*) en présence d'ADN, alors que les longueurs d'onde d'absorption ($\lambda_{abs(1-PE)}$) deviennent plus grandes (*red-shift*), diminuant ainsi le décalage de Stokes. Les TPAs présentent néanmoins des différences selon leur structure. Pour chaque famille chimique, le représentant 3-branches possède une meilleure absorption 1-photon (ϵ) par rapport au représentant 2-branches. C'est en revanche la nature chimique qui conditionne le rendement quantique de fluorescence en se référant aux valeurs mesurées en présence d'ADN (Bzim>>Pyo>Py). De manière générale, les TPAs possèdent de très bonnes caractéristiques d'absorption 2-photon avec des valeurs σ^2 comprises entre 250 et 500 GM pour des longueurs d'excitation 2-photon ($\lambda_{exc(2-PE)}$) situées dans la fenêtre 830-860 nm. Ces longueurs d'ondes sont incluses dans la fenêtre phototherapeutique et font des TPAs de bons candidats à la PDT 2-photon. Pour confirmer le potentiel d'utilisation de l'ensemble des TPAs comme photosensibilisateurs, nous avons ensuite vérifié leur capacité à photo-induire la mort cellulaire sous excitation 1- ou 2-photon.

		$\lambda_{abs(1-PE)} (nm)$	$\epsilon (M^{-1}.cm^{-1})$	Φ_F	$\lambda_{exc(2-PE)} (nm)$	$\sigma^2 (GM)$	$\sigma^2 \times \Phi (GM)$	$\lambda_{em} (nm)$	Study
TP2Py		- ADN	473	39,900	nd	840	nd	633	Ref. 13
		+ ADN	506	31,400	0.08	860	325	637	
TP3Py		- ADN	477	34,800	nd	810	2.47	656	This study
		+ ADN	501	43,760	0.01	830	500	641	
TP2Bzim		- ADN	439	19,670	nd	800	1.6	607	This study
		+ ADN	476	39,130	0.54	830	495	576	
TP3Bzim		- ADN	433	68,900	nd	740	nd	620	Ref. 13
		+ ADN	457	62,400	0.34	760	764	572	
TP2Pyo		- ADN	460	14,770	nd	830	1.6	637	This study
		+ ADN	494	25,380	0.17	850	365	610	
TP3Pyo		- ADN	456	44,840	nd	880	2.3	638	This study
		+ ADN	485	51,460	0.08	830	388	611	

Tableau 1. Caractéristiques spectroscopiques d'absorption 1- et 2-photons et d'émission de fluorescence des différents TPAs étudiés. Les mesures ont été réalisées dans un tampon Tris en présence ou non d'ADN.

Dans les cellules vivantes, les composés TP3Py, TP2Bzim, TP2Pyo et TP3Pyo réagissent toutes de la même manière sous excitation 1-photon et similairement aux composés TP2Py et TP3Bzim préalablement caractérisés¹⁸¹. Après incubation des cellules HeLa en présence de

TPAs (2 μ M), on observe une localisation initiale cytoplasmique des molécules (Figure 1). Sous excitation lumineuse, les molécules se délocalisent du cytoplasme pour se relocaliser dans le noyau (images de fluorescence). Lorsqu'elles sont dans le noyau, elles présentent une exaltation de fluorescence par rapport au cytoplasme, ce qui concorde bien avec les caractéristiques *in vitro* mesurées en présence d'ADN. De façon concomitante à la relocalisation nucléaire des TPAs, on observe une contraction cellulaire suivie de l'apparition de bourgeonnements membranaires (images en transmission DIC), deux caractéristiques spécifiques de l'apoptose^{25,182}. Ces phénomènes de relocalisation nucléaire et de bourgeonnements membranaires sont induits uniquement sous excitation lumineuse. En effet, seules les cellules illuminées présentent ces caractéristiques (Figures 1B, D, F, G) ; les cellules restées à l'obscurité conservent une localisation cytoplasmique des molécules et une morphologie cellulaire intacte.

Néanmoins, il existe quelques différences entre les molécules. TP2Bzim (Figure 1A) et TP2Pyo (Figure 1E) présentent une forte fluorescence dans le cytoplasme ; tandis que TP3Py (Figure 1C) et TP3Pyo (Figure 1G) ont une fluorescence cytoplasmique très faible, qui suit en 1^{ère} approximation les rendements quantiques de fluorescence qui sont plus faibles pour les composés TP3Py et TP3Pyo comparativement aux deux autres composés (Tableau 1). De plus, les phénomènes photo-induits apparaissent plus tardivement pour TP2Pyo et TP3Pyo. La relocalisation nucléaire commence rapidement pour TP2Bzim (20 min) et TP3Py (60 min), alors qu'elle est plus lente pour TP2Pyo (90 min) et TP3Pyo (230 min), avec un maximum de la relocalisation atteint au-delà de 3 heures et 5 heures d'illumination continue, respectivement pour TP2Pyo et TP3Pyo. De même, le phénomène de bourgeonnement membranaire se manifeste très tard pour TP3Pyo (à partir de 120 min), par rapport aux autres molécules (entre 30 et 60 min).

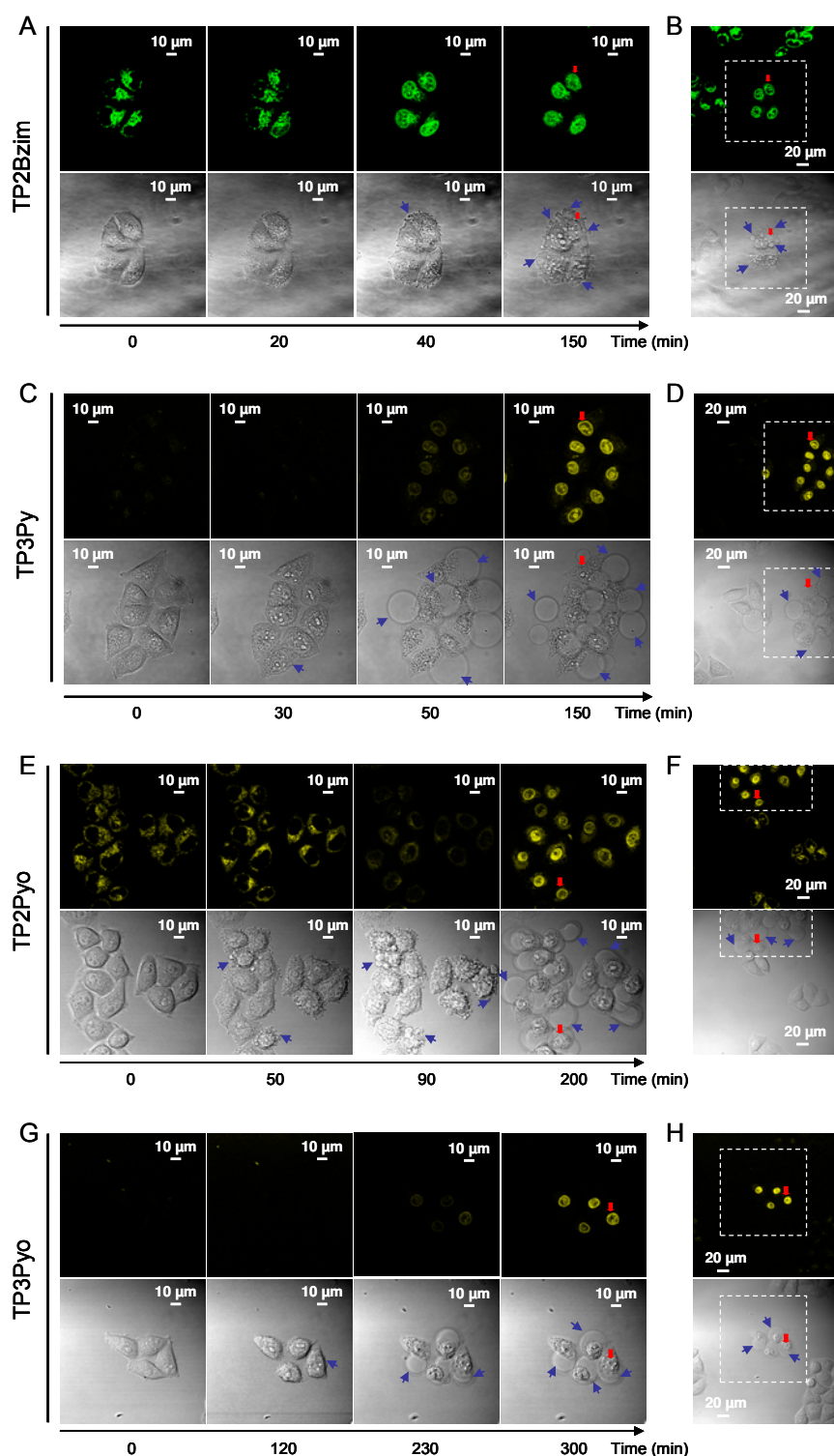


Figure 1. Imagerie cellulaire des TPAs sous excitation 1-photon. Les cellules HeLa ont été incubées avec 2 μM de TPAs pendant 2h dans l'obscurité, puis imagées sous illumination continue en 1-photon. Les TPAs ont été excitées à 458 nm (irradiance, 30 mW/cm^2). La fluorescence émise par TP2Bzim (A, B) a été recueillie à 530-690 nm alors que les fluorescences émises par TP3Py (C, D), TP2Pyo (E, F) et TP3Pyo (G, H) ont été recueillies à 560-720 nm. Les images de droite (B, D, F, H) présentent des champs d'observation élargis après l'illumination continue, afin de comparer les cellules éclairées en continue (délimitées par un encadré blanc en ligne pointillée) et les cellules restées à l'obscurité. Les flèches rouges servent de repère. Les images en transmission (DIC pour *Differential interference contrast*) sont montrées sous les images de fluorescence. Les flèches bleues désignent les bourgeonnements membranaires témoignant de la mort cellulaire.

Sous illumination continue 2-photon, les TPAs ne réagissent pas toutes de la même manière, en comparaison à la condition d'excitation 1-photon (Figure 2). Les cellules HeLa traitées avec TP2Bzim montre une relocalisation nucléaire et une formation de bourgeonnement membranaire sous excitation 2-photon (Figure 2A), comme observées précédemment avec TP2Py et TP3Bzim¹⁸³. En revanche, l'excitation biphotonique de TP3Py (Figure 2C), TP2Pyo (Figure 2D) et TP3Pyo (Figure 2E) n'induit aucun de ces phénomènes. En effet, lorsqu'on mesure l'intensité intracellulaire des molécules, on remarque une diminution de la fluorescence pour TP2Bzim en fonction du temps d'illumination, suivie d'une forte augmentation correspondant, respectivement, à la délocalisation cytoplasmique et à la relocalisation nucléaire. Tandis que pour TP3Py (Figure 2F), TP2Pyo (Figure 2G) et TP3Pyo (Figure 2H), on observe uniquement une diminution continue de l'intensité de fluorescence cytoplasmique, correspondant aux photoblanchiments des molécules. Ces résultats indiquent que contrairement à TP2Bzim (et aussi TP2Py et TP3Bzim)¹⁸³, TP3Py, TP2Pyo et TP3Pyo ne sont pas capables d'induire la mort cellulaire sous excitation 2-photon, très certainement pour des raisons liées aux photo-dommages des molécules elle-même.

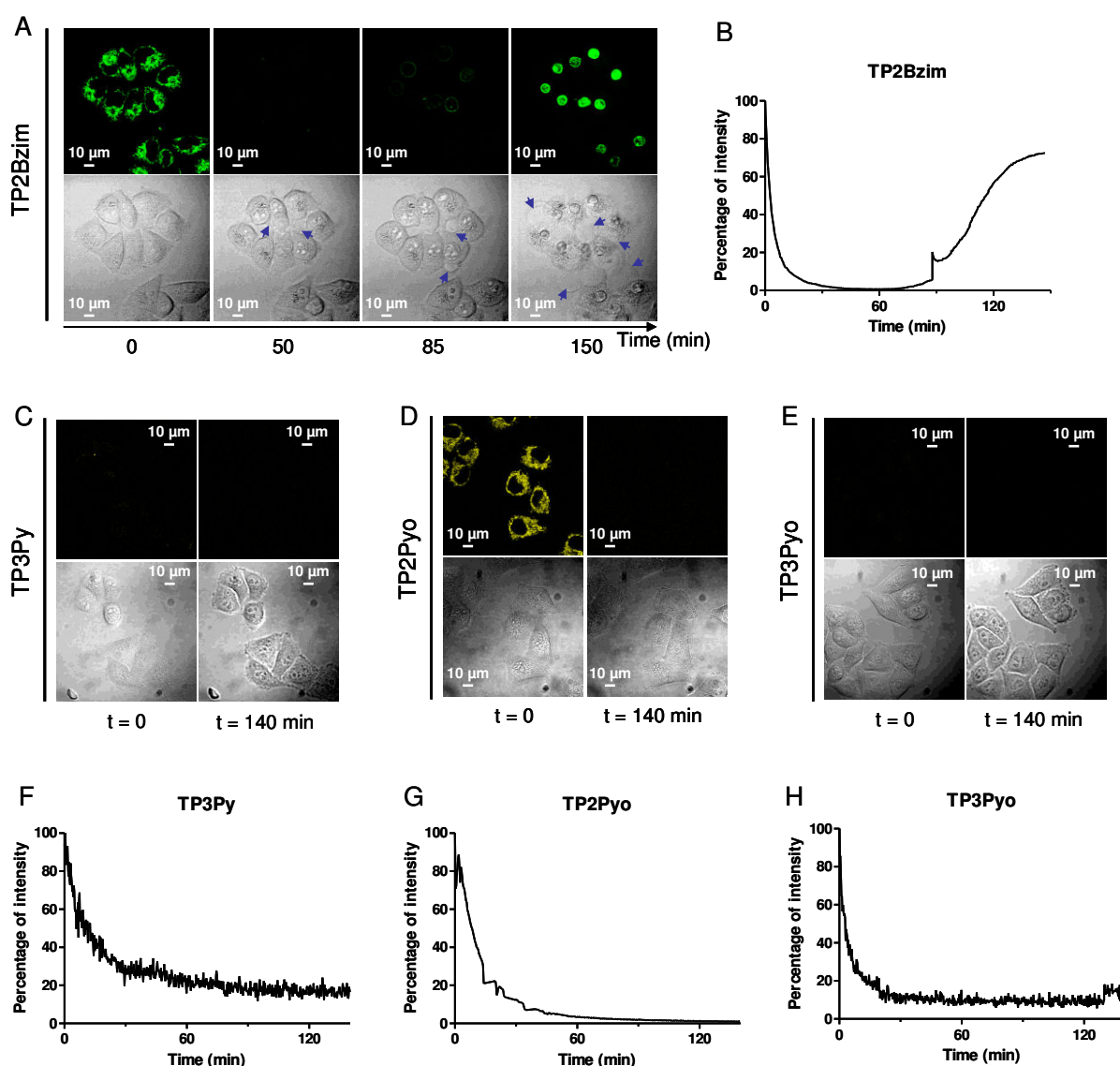


Figure 2. Imagerie 2-photon des cellules HeLa traitées par les TPAs. Les cellules HeLa ont été incubées avec 2 μM de TPAs pendant 2h dans l'obscurité, puis excitées en 2-photon à l'aide d'un laser infrarouge pulsé réglé à 830 nm pour TP2Bzim (A), TP3Py (C) et TP3Pyo (E) ou à 850 nm pour TP2Pyo (D) (irradiance : 1,25 W/cm²). Les fluorescences ont été recueillies à 560-690 nm pour TP2Bzim et 560-720 nm pour TP3Py, TP2Pyo et TP3Pyo. Les images en transmission (DIC) sont montrées sous les images de fluorescence. Les flèches bleues indiquent les bourgeonnements membranaires témoignant de la mort cellulaire. Les graphiques (B, F, G et H) représentent une normalisation de l'intensité de fluorescence cellulaire totale en fonction du temps (moyenne de trois cellules).

Précédemment, nous avons démontré que TP2Py avait une localisation initiale (avant illumination continue) essentiellement mitochondriale, alors que TP3Bzim se localisait initialement dans les mitochondries et dans les endosomes tardifs. La figure 3 présente les co-localisations des quatre autres TPAs avec les mitochondries et les endosomes tardifs dans les cellules HeLa. On peut voir que TP2Bzim et TP2Pyo se localisent principalement dans les mitochondries, avec une faible localisation dans les endosomes tardifs. Au contraire, TP3Pyo

se localise préférentiellement dans les endosomes tardifs, avec toutefois une faible localisation dans les mitochondries. Quant à TP3Py, elle se localise dans les endosomes tardifs et est totalement exclu des mitochondries.

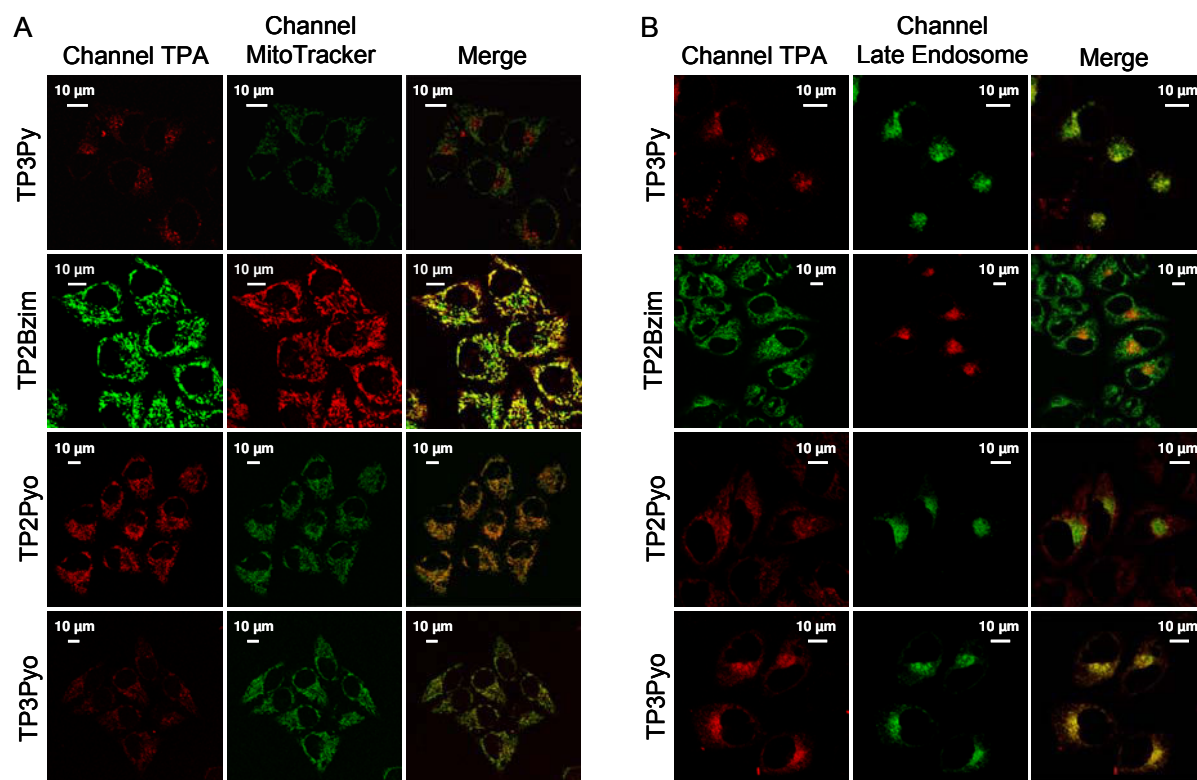


Figure 3. Co-localisation des TPAs avec les mitochondries et les endosomes tardifs. Les cellules HeLa ont été incubées avec 2 μ M de TPAs puis traitées avec différents marqueurs. Les mitochondries (A) ont été marquées par un MitoTracker Green (excitation à 488 nm ; émission 500-550 nm) ou MitoTracker Red (excitation à 633 nm ; émission 640-705 nm) (voir détails dans la section Matériels et Méthodes). Les endosomes tardifs (B) ont été marqués par une protéine recombinante Rab7-cerulean s'exprimant spécifiquement dans ces organelles (excitation 458 nm, émission 465-510 nm). Les points jaunes sur les superpositions d'images (*merge*) indiquent les co-localisations.

Nous avons montré précédemment que TP3Bzim et TP2Py présentaient des profils de cinétiques de mort cellulaire différentes, avec une induction de l'apoptose tardive/nécrose intervenant plus précocement avec TP2Py qu'avec TP3Bzim ; alors que la cinétique globale de mort cellulaire était plus rapide avec TP3Bzim. Afin de déterminer si la localisation subcellulaire initiale des différents composés conditionne le type de mort cellulaire, nous avons réalisé une analyse par cytométrie en flux (test Annexine V/DAPI) des cellules traitées avec les composés TP3Py, TP2Bzim, TP2Pyo et TP3Pyo. Dans cette expérience, l'Annexine V marque l'ensemble des cellules mortes (suite à la reconnaissance rendue possible des phosphatidylsérines (PS) membranaires¹⁸⁴). Le double marquage avec le DAPI permet de

discriminer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques (ou apoptotiques tardives). En effet, l'Annexine V peut reconnaître les PS suite à l'inversion de polarité membranaire survenant au cours de l'apoptose, ou bien profitant des dommages physiques membranaires survenant au cours de la nécrose ; tandis que le DAPI pénètre uniquement dans les cellules dont la membrane est endommagée (perméabilisée). Ainsi, le marquage Annexine V⁺/DAPI⁺ caractérise les cellules nécrotiques alors que le marquage Annexine V⁺/DAPI⁻ caractérise les cellules apoptotiques.

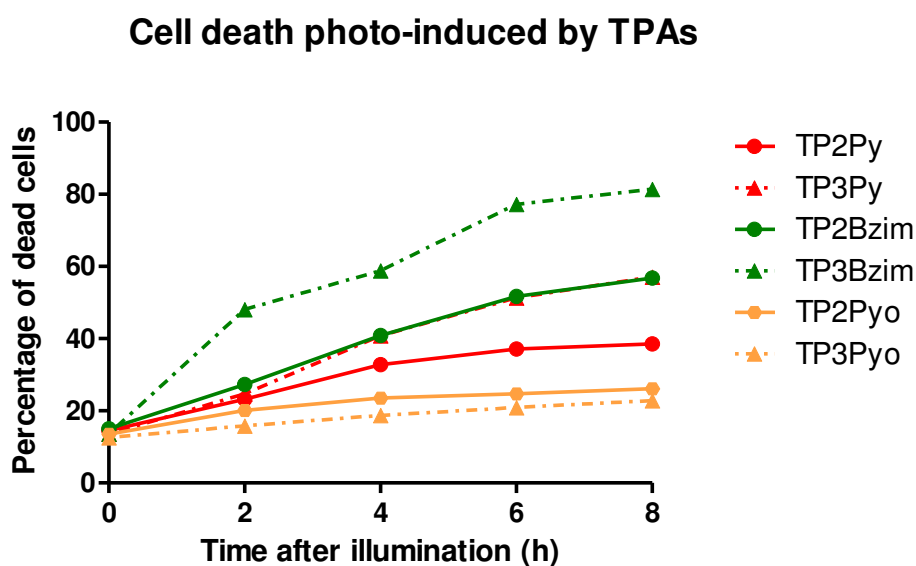


Figure 4. Cinétique d'évolution de la mort cellulaire totale photo-induite par les différents TPAs et analysée par cytométrie en flux. Les cellules Jurkat ont été traitées avec 2 μ M de TPAs pendant 2h et illuminées à 452 nm (\pm 45 nm) pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées à l'obscurité, puis une partie de chaque échantillon a été prélevée à différents temps, i.e. à t = 0 soit juste après la période d'illumination puis, ensuite, toutes les deux heures jusqu'à t = 8h, et marquée par l'Annexine V/DAPI. Les courbes ci-dessus représentent le nombre total de cellules mortes (Annexine V⁺) mesuré par cytométrie en flux.

En observant la cinétique d'évolution de la mort cellulaire totale photo-induite par les TPAs (cellules Annexine V⁺) (Figure 4), il apparaît clairement que TP2Pyo et TP3Pyo induisent une mort cellulaire beaucoup plus lentement que les quatre autres composés (TP2Py, TP3Py, TP2Bzim et TP3Bzim). TP3Bzim est la plus efficace, TP2Bzim et TP3Py ont la même efficacité et une efficacité intermédiaire alors que TP2Py est la moins efficace. Les molécules portant le groupement accepteur d'électron de type Py ou Bzim sont donc plus efficaces que les dérivés Pyo, et dans chaque famille, Py ou Bzim, le composé possédant trois branches vinyliques induit une mort cellulaire plus rapide que son homologue possédant deux branches.

En prenant en compte le double marquage Annexine V/DAPI, nous pouvons déterminer le type de mort cellulaire photo-induite par les TPAs. La figure 5 représente la différence de populations de cellules entre l'apoptose précoce (Annexine V⁺/DAPI⁻) et l'apoptose tardive/nécrose (Annexine V⁺/DAPI⁺) induites uniquement par l'illumination des TPAs. Toutes les molécules photo-activées provoquent un début de mort cellulaire en faveur de la nécrose. Cette différence négative correspond à une accélération du processus apoptotique des cellules déjà en apoptose avant irradiation (comme observé avec les TPAs sans éclaircissement ; Annexe 1), qui passent alors en apoptose tardive/nécrose après irradiation. L'augmentation au cours du temps de la différence entre l'apoptose et la nécrose/apoptose tardive montre bien une induction de l'apoptose médiée par la photo-activation des TPAs (Figure 5 et Annexe 1). Cette phase concerne toutes les TPAs, avec néanmoins des cinétiques différentes. Toutefois, une différence notable, à des temps plus longs, semble distinguer les TPAs 2-branches des TPAs 3-branches. En effet, pour les TPAs possédant trois branches vinyliques, on observe une augmentation continue de l'apoptose. Les TPAs possédant deux branches vinyliques montrent bien cette augmentation de l'apoptose après irradiation, mais cette phase est systématiquement suivie d'une diminution de l'apoptose en faveur de l'apoptose tardive/nécrose. Cette tendance est également observée pour les TP-Pyo dont l'efficacité est pourtant moindre que celle des dérivés Bzim ou Py comme décrit plus haut.

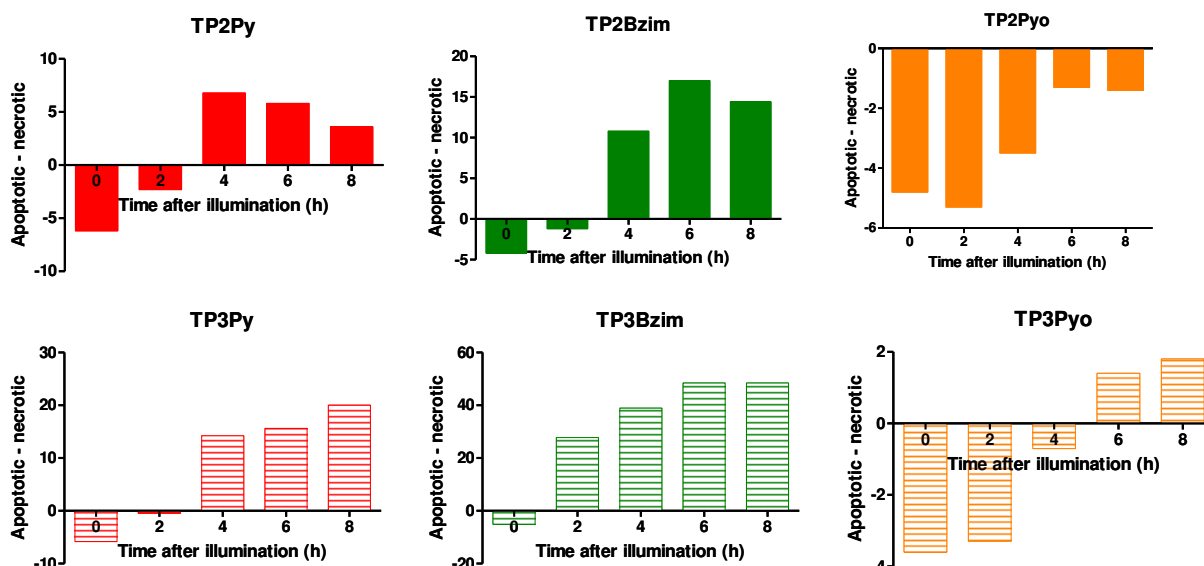


Figure 5. Différenciation de la mort cellulaire photo-induite par les TPAs et analysée par cytométrie en flux. Les graphiques ci-dessus représentent la différence entre le pourcentage de cellules en apoptose précoce (*apoptotic*, Annexine V⁺/DAPI⁻) et en nécrose/apoptose tardive (*necrotic*, Annexine V⁺/DAPI⁺) après une photo-activation des TPAs pendant 30 min comme indiquée dans la légende de la figure 4.

DISCUSSION

Les six molécules de la famille des TPAs étudiées sont toutes capables d'induire la mort cellulaire par leur photo-activation sous excitation 1-photon, néanmoins avec des efficacités différentes. En revanche, sous excitation biphotonique, seules TP2Py, TP2Bzim et TP3Bzim induisent la mort cellulaire. Les trois autres molécules (TP3Py, TP2Pyo et TP3Pyo) sont inefficaces sous excitation 2-photon et, en parallèle, montrent une diminution de leur fluorescence cellulaire au cours du temps. Ceci est probablement dû à un photoblanchiment des molécules, impliquant une plus forte susceptibilité au photoblanchiment pour ces trois molécules sous excitation 2-photon. Pour vérifier cette hypothèse, l'étude de la photostabilité des molécules *in vitro* sous excitation 2-photon, est en cours de réalisation.

Les expériences réalisées lors de cette étude ont permis d'établir les relations existant entre la structure chimique des molécules et leurs comportements dans le contexte cellulaire. Certaines de ces différences sont causées par la nature du groupement accepteur d'électron substitué aux molécules. De ce point de vue, les molécules portant un groupement ortho-pyridine (TP2Pyo et TP3Pyo) induisent une mort cellulaire beaucoup plus lente que pour les autres molécules (Figures 1 et 4). Ces molécules possèdent une longueur d'onde d'absorption maximum (entre 456 nm et 494 nm) proche des longueurs d'onde d'excitation utilisées (458 nm ou 452 nm) avec des coefficients d'extinction molaire similaires aux autres TPAs. Donc, en comparant avec les autres TPAs (Tableau 1), ni le maximum de longueur d'onde d'absorption, ni la valeur du coefficient d'extinction molaire n'explique la faible efficacité d'induction de mort cellulaire des TP-Pyo. La localisation initiale de ces composés ne paraît pas non plus être un caractère important et discriminant de ce point de vue, puisque celle-ci est définie par le nombre de branches vinyliques et non par la nature chimique de l'accepteur d'électron (voir ci-dessous). La cinétique lente et la relative inefficacité des TP-Pyo pour la photo-induction de la mort cellulaire sont donc probablement dues à une faible photo-réactivité de ces molécules liée à la nature du groupement accepteur d'électron.

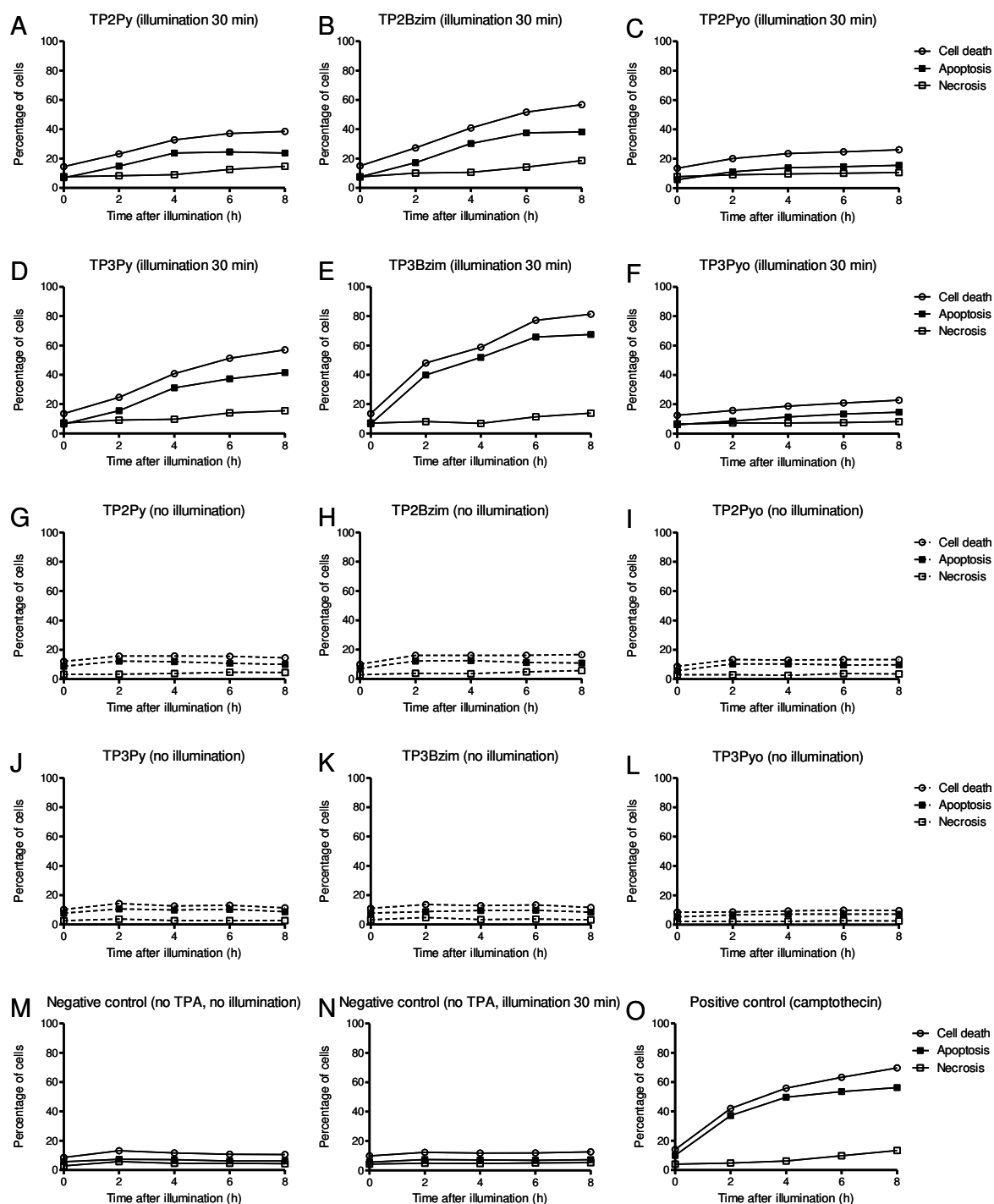
Pour les autres TPAs, les expériences de cinétique d'évolution de la mort cellulaire totale montrent que les molécules portant un groupement N-méthyl benzimidazolium (Bzim) semblent être plus efficaces dans l'induction de la mort cellulaire que les molécules portant un groupement pyridinium (Py). Cette disparité est probablement due à leurs différences d'absorption à la longueur d'onde d'excitation utilisée pour cette expérience (452 ± 45 nm). En effet, en comparant l'absorbance de ces quatre molécules à cette longueur d'onde (Annexe

2), on retrouve la même hiérarchie que celle observée pour l'efficacité d'induction de la mort cellulaire (Figure 4), à savoir TP3Bzim > TP2Bzim et TP3Py > TP2Py.

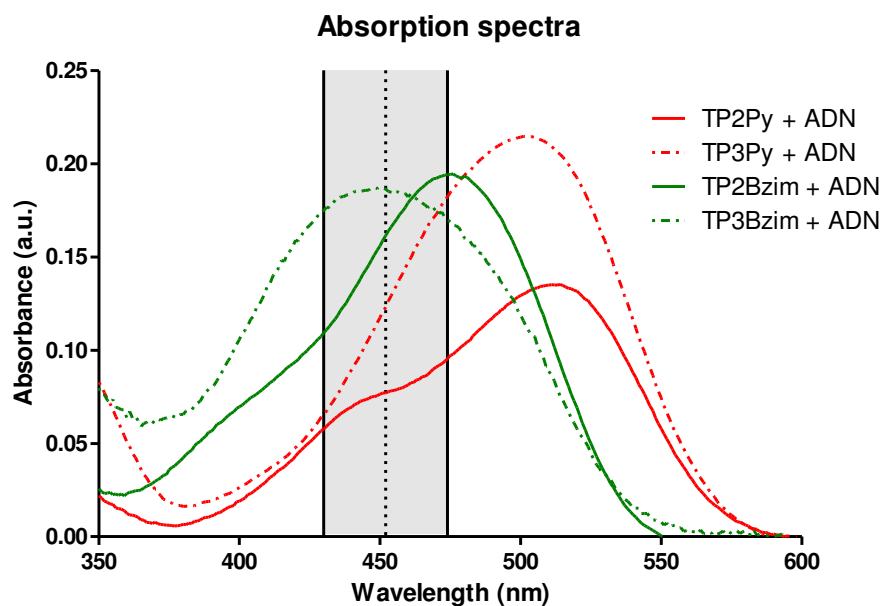
En revanche, la localisation subcellulaire des différents TPAs dépend du nombre de liens vinyliques portés par les molécules. Les résultats obtenus dans cette étude et dans les études précédentes mettent en évidence une localisation cellulaire initiale influencée par le nombre de branches porté par les TPAs (Annexe 3). La localisation cellulaire initiale des TPAs à deux branches (TP2) est préférentiellement mitochondriale avec une localisation résiduelle dans les endosomes tardifs. Inversement, les TPAs à trois branches (TP3) se localisent principalement dans les endosomes tardifs, avec une localisation partielle dans les mitochondries pour certaines d'entre elles (TP3Bzim et TP3Py). Cette localisation différentielle témoigne très certainement d'un mécanisme d'internalisation cellulaire différent entre les TPAs possédant deux ou trois branches.

Les TP2 présentent toutes un profil d'apparition de mort cellulaire de type apoptose tardive/nécrose à des temps plus longs après l'irradiation ; alors que pour les TP3, la mort cellulaire par apoptose augmente de façon continue. Cette cinétique d'évolution de la mort cellulaire n'est pas corrélée à l'efficacité globale des molécules. En effet, pour les deux séries les plus efficaces, c'est-à-dire TP-Bzim et TP-Py, la molécule 3-branches est plus efficace que la molécule 2-branches (TP3Bzim > TP2Bzim et TP3Py > TP2Py ; Figure 4) pour des raisons d'absorption optimale par rapport au dispositif instrumental, comme évoqué précédemment. Pour cette raison, il est plus probable que l'augmentation de l'apoptose tardive/nécrose observée pour les TP2 corresponde davantage à une photo-induction de la nécrose qu'à une évolution de l'apoptose précoce en apoptose tardive. Si le lien direct ou indirect avec la localisation initiale différentielle des familles 2- et 3-branches semble établi, le mécanisme sous-jacent responsable du type de mort cellulaire induit par chacune des familles en terme qualitatif n'est pas clarifié à ce jour.

En conclusion, les molécules TP2Pyo et TP3Pyo présentent peu d'intérêt pour la PDT puisqu'elles sont peu efficaces en 1-photon et pas du tout efficaces en 2-photon. TP3Bzim et TP3Py présentent les meilleures efficacités d'induction de la mort cellulaire sous excitation 1-photon. Cependant, TP3Py n'induit pas de mort cellulaire sous excitation 2-photon. Donc, parmi les six TPAs étudiées, TP3Bzim représente la molécule la plus prometteuse pour une utilisation en PDT 2-photon.



Annexe 1. Etude cinétique et différenciation des types de mort cellulaire photo-induite par les TPAs étudiées par cytométrie en flux. (A-F) Les cellules Jurkat ont été traitées avec 2 μ M de TPAs pendant 2h et illuminées à 452 nm (\pm 45 nm) pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été incubées à l'obscurité, puis une partie de chaque échantillon a été prélevée à différents temps, i.e. à t = 0 soit juste après la période d'illumination puis, ensuite, toutes les deux heures jusqu'à t = 8h, et marquée par l'Annexine V/DAPI. Les cellules apoptotiques (*apoptosis*) sont représentées par les cellules Annexine V⁺/DAPI⁻ ; les cellules Annexine V⁺/DAPI⁺ représentent les cellules nécrotiques (*necrotic*) ; l'addition de ces deux sous-populations représente le pourcentage total de mort cellulaire (*cell death*). (G-O) Les contrôles expérimentaux négatifs (cellules non traitées aux TPAs - irradiées ou pas - et cellules traitées aux TPAs non-irradiées) ou positifs (cellules traitées à la Camptothécine) sont explicitement mentionnés sur la figure. Les détails expérimentaux et les réglages utilisés pour le cytomètre sont reportés dans la section Matériels et Méthodes.



Annexe 2. Spectres d'absorption des dérivés Py et Bzim. Les spectres d'absorption des TPAs ont été mesurés *in vitro* en présence d'ADN. La région en gris représente la bande passante des longueurs d'onde sélectionnées par le filtre d'excitation utilisées pour la cytométrie en flux (452 ± 45 nm).

	Mitochondria	Late endosome	Study
TP2Py	+++	+	Ref. 13
TP3Py	-	+	This study
TP2Bzim	+++	+	This study
TP3Bzim	++	+++	Ref. 13
TP2Pyo	++	+	This study
TP3Pyo	+	+++	This study

Annexe 3. Tableau récapitulatif des localisations cellulaires initiales des TPAs. Les signes (+) ou (–) indiquent la présence ou pas du TPA dans l'organite cellulaire.

- (1) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 380-387.
- (2) Baggaley, E.; Gill, M. R.; Green, N. H.; Turton, D.; Sazanovich, I. V.; Botchway, S. W.; Smythe, C.; Haycock, J. W.; Weinstein, J. A.; Thomas, J. A. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 3367-3371.
- (3) Yuan, L.; Wang, L.; Agrawalla, B. K.; Park, S.-J.; Zhu, H.; Sivaraman, B.; Peng, J.; Xu, Q.-H.; Chang, Y.-T. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 5930-5938.
- (4) Packer, A. M.; Peterka, D. S.; Hirtz, J. J.; Prakash, R.; Deisseroth, K.; Yuste, R. *Nature Methods* **2012**, *9*, 1202-1205.
- (5) Prakash, R.; Yizhar, O.; Grewe, B.; Ramakrishnan, C.; Wang, N.; Goshen, I.; Packer, A. M.; Peterka, D. S.; Yuste, R.; Schnitzer, M. J.; Deisseroth, K. *Nature Methods* **2012**, *9*, 1171-1179.
- (6) Gallavardin, T.; Maurin, M.; Marotte, S.; Simon, T.; Gabudean, A.-M.; Bretonnière, Y.; Lindgren, M.; Lerouge, F.; Baldeck, P. L.; Stéphan, O.; Leverrier, Y.; Marvel, J.; Parola, S.; Maury, O.; Andraud, C. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10*, 1216-1225.
- (7) Qian, J.; Wang, D.; Cai, F.; Zhan, Q.; Wang, Y.; He, S. *Biomaterials* **2012**, *33*, 4851-4860.
- (8) Dumat, B.; Bordeau, G.; Aranda, A. I.; Mahuteau-Betzer, F.; Harfouch, Y. E.; Metgé, G.; Charra, F.; Fiorini-Debuisschert, C.; Teulade-Fichou, M.-P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10*, 6054-6061.
- (9) Dumat, B.; Bordeau, G.; Faurel-Paul, E.; Mahuteau-Betzer, F.; Saettel, N.; Metge, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Teulade-Fichou, M.-P. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 12697-12706.
- (10) Chennoufi, R.; Bougherara, H.; Gagey-Eilstein, N.; Dumat, B.; Henry, E.; Subra, F.; Mahuteau-Bretzer, F.; Tauc, P.; Teulade-Fichou, M.-P.; Deprez, E. *Chemical Communications* **2015**.
- (11) Coleman, M. L.; Sahai, E. A.; Yeo, M.; Bosch, M.; Dewar, A.; Olson, M. F. *Nature Cell Biology* **2001**, *3*, 339-345.
- (12) Wickman, G. R.; Julian, L.; Mardilovich, K.; Schumacher, S.; Munro, J.; Rath, N.; Zander, S. A.; Mleczak, A.; Sumpton, D.; Morrice, N.; Bienvenut, W. V.; Olson, M. F. *Cell Death & Differentiation* **2013**, *20*, 1293-1305.
- (13) Chennoufi, R.; Bougherara, H.; Gagey-Eilstein, N.; Dumat, B.; Henry, E.; Subra, F.; Bury-Moné, S.; Mahuteau-Bretzer, F.; Tauc, P.; Teulade-Fichou, M.-P.; Deprez, E.
- (14) Li, Y.; Wang, H.; Tarus, B.; Perez, M. R.; Morellato, L.; Henry, E.; Berka, V.; Tsai, A.-L.; Ramassamy, B.; Dhimane, H.; Dessy, C.; Tauc, P.; Boucher, J.-L.; Deprez, E.; Slama-Schwok, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 12526-12531.
- (15) Koopman, G.; Reutelingsperger, C. P.; Kuijten, G. A.; Keehnen, R. M.; Pals, S. T.; Oers, M. H. v. *Blood* **1994**, *84*, 1415-1420.

IV- Caractérisation et identification de Nanotriggers de deuxième génération pour imager et photo-déclencher la production de NO dépendante de la NOS

La molécule Nanotrigger 1 (NT1) est le premier générateur de NO ciblant le site de liaison du NADPH sur la NOS et initiant le transfert d'électron à travers la NOS sous excitation lumineuse. Dans cette étude, nous avons caractérisé sept autres molécules de type NT présentant des variations de structure et différant de NT1, appelées NT de deuxième génération. Ces molécules présentent la même structure générale que NT1 : une partie nucléotidique permettant la reconnaissance et la fixation sur le site de liaison du NADPH de la NOS, et une partie chromophorique remplaçant la partie nicotinamide du NADPH et permettant de générer un transfert d'électron sous excitation 1- ou 2-photon. Cependant, la partie nucléotidique des NT de deuxième génération possède un ou deux groupements carboxylate sur le ribose, remplaçant le groupement phosphate du NADPH et de NT1, permettant une synthèse chimique simplifiée. De plus, la partie chromophorique présente deux types de groupement terminal : NH_2 et NH -méthyle. L'objectif de cette étude a été d'évaluer la capacité de ces NT de deuxième génération à pénétrer dans les cellules endothéliales, à cibler la eNOS et à initier le transfert d'électron aboutissant à la production de NO sous excitation lumineuse.

Les expériences d'imagerie multiphoton cellulaire ont montré une différence d'intensité de fluorescence des molécules dans les cellules qui n'est pas corrélée aux brillances 2-photons mesurées *in vitro*, mais soulignant davantage une différence dans la capacité à pénétrer dans les cellules ou à cibler la NOS. L'étude de la co-localisation des NT de deuxième génération avec l'appareil de Golgi, l'organite cellulaire dans lequel se situe la eNOS, a révélé une corrélation entre l'intensité de fluorescence des molécules et leur capacité à cibler la eNOS. Ainsi, deux molécules présentant une forte fluorescence dans les cellules et une importante co-localisation avec l'appareil de Golgi ont pu être identifiées : NT4 et NT5 qui ont comme point commun la présence d'un unique groupe carboxylate en position 3' du ribose. Lorsque les cellules endothéliales, traitées par les NT de deuxième génération, ont été excitées en continu en 1- ou 2-photon, seules NT4 et NT5 ont montré une induction de la mort cellulaire. De plus, lorsque ces cellules sont aussi traitées par différents inhibiteurs, tels que le NAC

(inhibiteur de ROS), le L-NAME (inhibiteur du domaine oxygénase de la NOS), ou NS1 (inhibiteur de la NOS ciblant le site de liaison du NADPH), seuls les inhibiteurs de la NOS protègent les cellules de la mort induite par la photo-activation de NT4 et NT5. Ces résultats suggèrent fortement une production de NO dépendante de la NOS induite par la photo-activation de NT4 et NT5. Les expériences de photoblanchiment confortent cette suggestion, puisque seulement la présence de NS1 (compétiteur des NT pour la fixation sur la NOS) et non pas L-NAME entraîne une inhibition de la diminution de fluorescence de NT4 et NT5, renforçant l'idée que ces molécules sont bien oxydées par la eNOS sous excitation lumineuse.

D'un point de vue structural, NT4 et NT5 présentent la même partie nucléotidique, elles possèdent un groupement carboxylate en position 3' du ribose. L'ensemble des résultats présentés dans cette étude semblent s'accorder sur l'influence de cette structure chimique sur la capacité de NT4 et NT5 à pénétrer dans les cellules endothéliales, à cibler la eNOS et à générer un transfert d'électron à travers la eNOS.

INTRODUCTION

Le NO est un petit médiateur gazeux jouant un rôle important dans la physiologie des mammifères, notamment dans la régulation de la pression artérielle, la neurotransmission et les réponses immunitaires⁹². NO est naturellement produit par les NO synthases (NOS), une famille d'hémoprotéines catalysant l'oxydation de la L-arginine formant ainsi la L-citruline et le NO. Cette catalyse se fait grâce à l'oxydation de NADPH par la NOS. La NOS est constituée d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase liés par un domaine de liaison de la calmoduline (CaM). Le domaine réductase possède des sites de liaison au NADPH et aux co-facteurs flaviniques FAD et FMN⁷⁵. Le domaine oxygénase possède des sites de liaison de l'hème, de la L-arginine et du co-facteur (6*R*)-5,6,7,8-tetrahydro-l-biopterin (BH₄). La liaison de la CaM à son site de fixation permet le transfert d'électrons du FMN à l'hème^{70,185}.

Les modifications du taux de NO dans l'organisme sont impliquées dans de nombreuses pathologies dans les systèmes cardiovasculaire, nerveux et immunitaire. Depuis la découverte du NO, il y a 80 ans, la régulation de la production de cette molécule fait l'objet de nombreuses recherches biologiques et cliniques. De nombreux régulateurs ont été synthétisés afin de rétablir des taux de NO physiologiques. Les inhibiteurs de la NOS connus et fréquemment utilisés sont principalement des cibles du domaine oxygénase de l'enzyme. Parmi ceux-là, se trouvent des analogues de la L-arginine¹⁵⁶ se fixant à la NOS de manière compétitive et inhibant l'étape finale de production du NO ; mais aussi des inhibiteurs de l'hème sous forme d'analogues de BH₄ ou d'agents liant le fer¹⁸⁶. D'autres inhibiteurs bloquent le transfert d'électron au niveau de la CaM ou des flavines du domaine réductase. Récemment, un inhibiteur compétitif vis-à-vis du NADPH a été développé, appelé Nanoshutter (NS1)¹⁶²; il se fixe au site de liaison du NADPH sur la NOS et bloque l'initiation du transfert d'électron. La structure de cet inhibiteur est basée sur la structure du NADPH, plus particulièrement sur la partie nucléotidique du NADPH qui permet la reconnaissance et la fixation au site de liaison dans la NOS, NS1 possède donc une partie nucléotidique similaire à celle du NADPH. En revanche, la partie nicotinamide du NADPH est remplacée par une partie chromophorique. La partie chromophorique de NS1 est constituée d'un stilbène conjugué substitué aux deux groupes donneurs d'électrons, ayant une forte absorption 2-photon. Au niveau terminal du chromophore de NS1, un groupe accepteur d'électron (NO₂) a été choisi pour bloquer le flux d'électron, inhiber la catalyse par la NOS et moduler les propriétés de fluorescence de NS1. Il a été montré que NS1 est capable de lier la NOS avec

une forte affinité et d'inhiber efficacement le flux d'électron de la NOS. De plus, NS1 présente une exaltation de fluorescence lorsqu'il est fixé à la NOS par rapport à NS1 libre en solution, ce qui permet d'imager simultanément la NOS dans le contexte cellulaire sous excitation 1- ou 2-photon. D'un point de vue tissulaire, des expériences sur des aortes isolées ont montré que NS1 se fixait à la eNOS et inhibait l'angiogénèse médiée par le NO¹⁶³.

Les générateurs de NO, en revanche, ne ciblent pas directement la NOS. Ce sont principalement des précurseurs moléculaires, comme le N-diazeniumdidate¹⁸⁷, des dérivés du nitrobenzène¹⁸⁸ ou encore des complexes métal-nitrosyle¹⁸⁹. D'autres stratégies de production de NO implique des surfaces fonctionnalisées, comme le N-diazeniumdidate greffé à une couche de silice¹⁹⁰ ou des nanoparticules de platine à la surface desquelles sont greffés des précurseurs moléculaires photosensibles¹⁹¹. D'autres études se sont intéressées au contrôle de la production de NO par des molécules photo-activables ciblant la NOS, appelées Nanotrigger (NT). La première de ces molécules à avoir été synthétisée est NT1¹⁶⁵. La structure de NT1 est similaire à celle de NS1 en ce sens que ces molécules possèdent la même partie nucléotidique leur permettant ainsi de cibler la NOS. En revanche, elles se distinguent par leur partie chromophorique. La partie chromophorique de NT1 est constituée d'un fragment diène substitué à deux groupes donneurs d'électron, à l'extrémité de laquelle se trouve un groupement donneur d'électron (NH₂). Tout comme NS1, cette partie chromophorique confère également de bonnes propriétés d'absorption non-linéaire de la lumière¹⁶². NT1 a montré sa capacité à se fixer au site NADPH de la NOS¹⁶⁵, mais aussi à générer le flux d'électrons *in vitro*^{164,169}. En effet, sous excitation lumineuse, le groupe amine terminal de NT1 est capable de transférer des électrons au FAD, ce qui induit le flux d'électron. NT1 permet donc une production photo-induite de NO sous excitation 1- et 2-photon, en initiant la catalyse de NO par la NOS^{166,168}.

Dans cette étude, nous présentons de nouvelles molécules de type NT pour initier le transfert d'électron dans la NOS et induire la production de NO ; ce sont les NT de deuxième génération, caractérisés par une synthèse simplifiée par rapport au composé prototype NT1. La structure et la synthèse de ces sept nouvelles molécules diffèrent de celles de NT1. Cette série a permis d'établir une relation structure-activité des NT de deuxième génération et, notamment, de déterminer l'influence du groupement donneur sur la partie chromophorique (NH₂ ou NH-Me) et de la carboxylation du ribose sur la partie nucléotidique (en 2' et/ou 3' du ribose) sur les propriétés de reconnaissance de la NOS cellulaire et d'initiation du flux d'électron sous irradiation. Nous avons tout d'abord caractérisé la série de NT de deuxième

génération du point de vue de leurs stabilités chimiques et photo-physiques et des leurs propriétés spectrophysiques (i.e. absorption et fluorescence 1- et 2-photon). Sur des cellules endothéliales, nous avons ensuite évalué la capacité des différents NT de deuxième génération à se localiser au niveau de l'appareil de Golgi, l'organite cellulaire où se situe la eNOS¹²⁹. Nous avons également déterminé leur aptitude à initier le transfert d'électron au niveau de la eNOS en cellule. Les expériences réalisées ont finalement permis de classer les sept molécules afin d'identifier celles qui présentent les meilleures caractéristiques en cellule ; notamment nous avons montré que la carboxylation sur la partie nucléotidique était compatible avec l'activité des NT en cellule, et que la position du groupement carboxylate jouait un rôle prépondérant pour l'efficacité des composés.

MATERIEL ET METHODES

Réactifs :

Les NT ont été synthétisés par l'équipe du Pr Joanne Xie (PPSM, UMR 8531, ENS Cachan)¹⁷⁵. Les molécules ont été conservées sous forme de poudre à -20°C. Une solution stock à 10 mM dans du DMSO a été préparée et conservée à -20°C pendant 1 semaine au maximum.

NS1 a été synthétisé comme décrit précédemment¹⁶². Le N-acetylcystéine (NAC), le N ω -Nitro-L-arginine méthyle ester (L-NAME), le diméthyl sulfoxyde (DMSO) et le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (MTT) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le 7-diéthylamino-4-méthylcoumarin a été acheté chez Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Allemagne).

Mesures spectrophysiques :

Les caractéristiques spectrales 1- et 2-photon des NT ont été mesurées dans le DMSO ou dans un tampon Tris 50 mM (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% DMSO.

Les spectres d'absorption et d'émission ont été obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre Uvikon XL (Bioserv) et d'un spectrofluorimètre Eclipse (Varian), respectivement. Les mesures 2-photon ont été réalisées à l'aide d'un montage mis en place au laboratoire¹⁶², utilisant un laser accordable en mode verrouillé à 80 MHz Ti:Saphire Mai Tai[®] (690-1040 nm, laser pulsé 100 fs ; Spectra Physics, Mountain View, CA, USA).

Culture cellulaire et traitements :

Les cellules endothéliales (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ont été cultivées dans des boîtes de Pétri dont le fond a été préalablement recouvert d'une fine couche

de gélatine à 0,2%, dans du milieu Endothelial Cell Growth Medium (Cell Applications, San Diego, USA). Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GibcoBRL) complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (GibcoBRL) et 1% de pénicilline/streptomycine (GibcoBRL). Ces deux types cellulaires ont été maintenus à 37°C, dans une atmosphère régulée à 5% CO₂, jusqu'à 95% de confluence. Les expériences sur les cellules HUVEC ont été réalisées sur des cellules n'excédant pas 5 passages.

Pénétration cellulaire :

Les cellules HUVEC ont étéensemencées dans des boîtes de culture à fond en verre WillCo-dish (Willco Wells, Amsterdam, Pays-Bas). A 90% de confluence, les cellules ont été imagées sans molécule. Les NT ont ensuite été introduits dans le milieu cellulaire à 5 µM et une image du même champ a été prise à différents intervalles de temps. Les images par excitation 2-photon ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal SP2 (Leica MicroSystems) équipé d'une chambre d'incubation à 37°C, avec atmosphère contrôlée à 5% CO₂, et d'un laser accordable en mode verrouillé à 80 MHz Ti:Sapphire Mai Tai® (720-920 nm, laser pulsé 100 fs ; Spectra Physics, Mountain View, CA, USA)¹⁶². Les NT ont été excitées en 2-photon à 760 nm et l'émission de fluorescence a été détectée entre 450 et 550 nm.

Co-localisation avec l'appareil de Golgi :

Les cellules HUVEC ont été incubées pendant 2h avec les NT (5 µM) à 37°C. Ensuite, elles ont été rincées avec du tampon phosphate (Phosphate Buffer Saline, PBS) et traitées avec le marqueur du Golgi BODIPY FL-ceramide (Molecular Probes) à une concentration de 5 µM pendant 1h. Puis les cellules ont été rincées avant observation par imagerie de fluorescence. Le marqueur a été excité par un laser continu à 548 nm et l'émission de fluorescence a été détectée entre 570 et 720 nm.

Photoblanchiment en cellule et bourgeonnement membranaire :

Les cellules HUVEC et HeLa ont été incubées avec 5 µM de NT pendant 2h à 37°C. Les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS avant observation par imagerie de fluorescence. En plus du traitement avec les NT, les cellules HUVEC ont été traitées ou non avec du NAC à 3 mM pendant 24h, du L-NAME à 100 µM pendant 3h ou du NS1 à 20 µM pendant 30 min. Les NT ont été excités en 2-photon à 760 nm pendant 15 min (fente d'émission : 450-550 nm). L'intensité de fluorescence des NT dans les cellules a été mesurée à l'aide du logiciel Leica Confocal Software.

Viabilité cellulaire :

Les cellules HUVEC ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits dont le fond a été préalablement couvert d'une fine couche de gélatine à 0,2%, à 10 000 cellules par puits. A 95% de confluence, les cellules ont été traitées pendant 2h avec du DMSO (contrôle) ou le dérivé NT à différentes concentrations. Les puits ont ensuite été illuminés ou non pendant 30 min à l'aide d'une lampe au xénon à une puissance de 15 mW et d'un filtre à 365 nm. Après 24h d'incubation à 37°C, la solution MTT a été ajoutée pendant 2h. Le formazan précipité a été dissout avec du tampon de lyse (SDS à 20%). L'absorbance du formazan a été mesurée par un lecteur de plaque (Victor X5, PerkinElmer) à 570 nm. Chaque condition expérimentale a été réalisée en triple.

RESULTATS

Structure des NT de deuxième génération. Les NT de deuxième génération ont été synthétisés par chimie « click ». Cette méthode de synthèse permet d'assembler différentes petites molécules synthétisées au préalable de manière simple, rapide et avec une grande efficacité^{172,173}. Elle permet ainsi d'obtenir une grande gamme de molécules différentes par chimie combinatoire. Les NT de deuxième génération concernent sept nouvelles molécules dont la structure des parties chromophorique et nucléotidique varie : NT2, NT3, NT4, NT5, NT6, NT7 et NT9 (Figure 1). La partie nucléotidique de ces NT présente une variation du groupement carboxylate sur le ribose. Ce groupement a été substitué au groupement phosphate présent sur NT1 afin de simplifier la synthèse. NT2 et NT3 possèdent deux groupements carboxylate sur les positions 2' et 3' du ribose, NT4 et NT5 possèdent un groupement carboxylate en 3' du ribose, NT6 et NT7 portent un groupement carboxylate en 2' du ribose et NT9 ne possède pas de groupement carboxylate. Sur la partie chromophorique, le groupement terminal a été modifié : les NT ayant un chiffre impair possèdent un groupement NH₂, tandis que les NT ayant un chiffre pair possèdent un NH-méthyle.

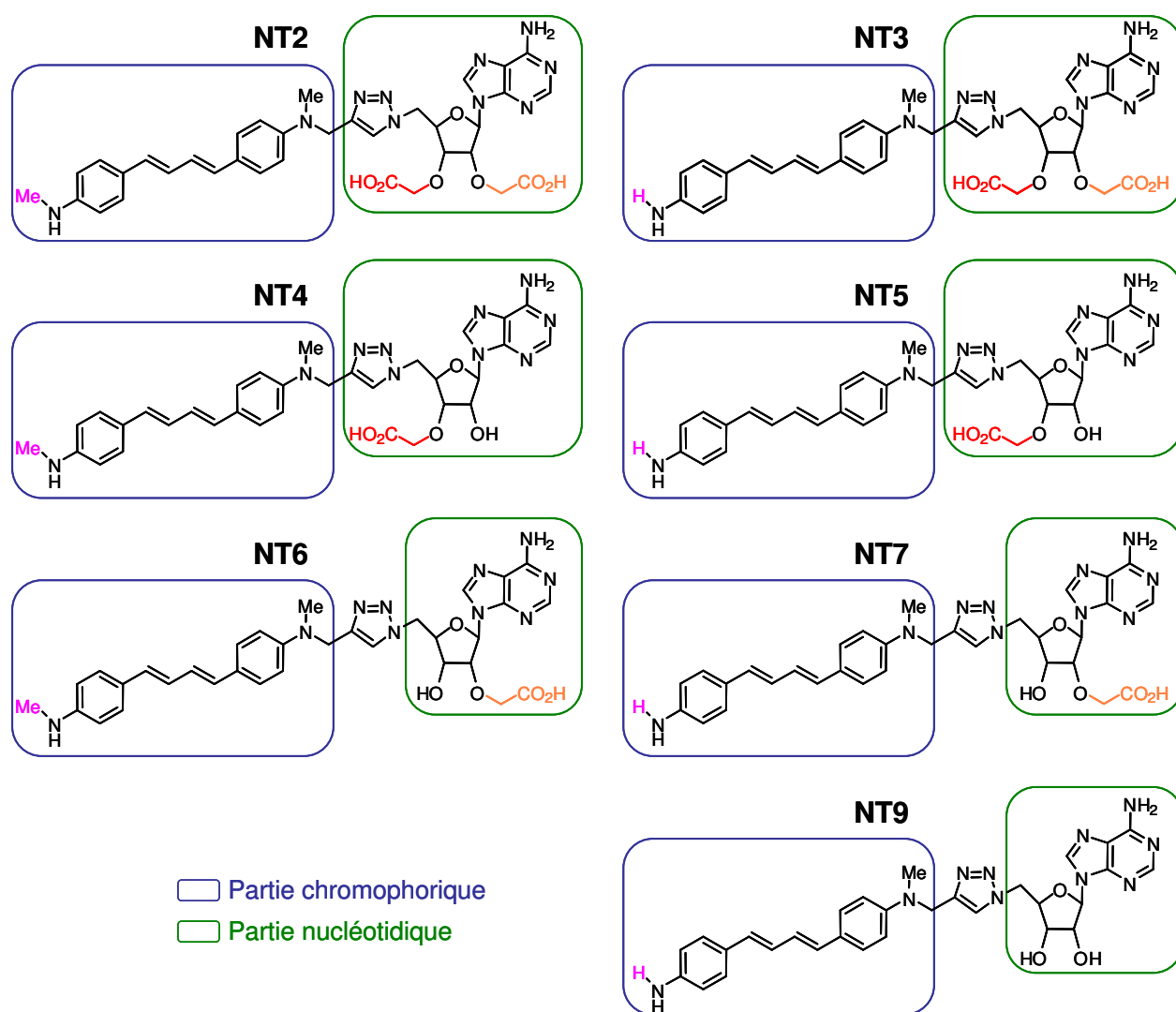


Figure 1. Structure des NT de deuxième génération. Les parties nucléotidiques (encadré vert) et chromophoriques (encadré bleu) présentent des différences de structure. Les NT pairs (gauche) présentent un NH-méthyle à l'extrémité terminale de leur partie chromophorique, tandis que les NT impairs (droite) conservent le NH₂ en terminal. NT2 et NT3 possèdent deux groupements carboxylate sur le ribose de la partie nucléotidique, NT4 et NT5 ne possèdent qu'un carboxylate en 3', NT6 et NT7 possèdent un carboxylate en 2' et NT9 ne possède pas de carboxylate.

Caractéristiques spectrophysiques des NT de deuxième génération. Les mesures spectroscopiques ont été réalisées de façon systématique dans un tampon Tris et dans le DMSO (Tableau 1). De manière générale, les caractéristiques spectrophysiques des NT diffèrent selon que les mesures sont faites dans le tampon Tris ou dans le DMSO. En effet, les coefficients d'extinction molaire (ϵ), le rendement quantique de fluorescence (*quantum yield*, ϕ) et la brillance en fluorescence 2-photon (*2-photon brightness*) sont plus élevés en DMSO. Les valeurs ϵ sont pratiquement doublées pour tous les composés dans le DMSO par rapport aux ϵ mesurés dans le Tris. De même, pour les sections efficaces d'absorption 2-photon ($\sigma_{2h\nu}$), les NT présentent une meilleure absorption 2-photon dans le DMSO que dans le tampon Tris

(deux à trois fois plus élevée). On observe également des différences dans les longueurs d'onde d'absorption 1-photon ($\lambda_{\text{max,absorption}}$) et les longueurs d'onde d'émission ($\lambda_{\text{max,émission}}$), avec respectivement un décalage vers le rouge et le bleu en DMSO. Ces différences entre le Tris et le DMSO montrent que les NT présentent d'une part, de meilleures propriétés d'absorption 1- et 2-photon, d'autre part, une forte sensibilité à l'environnement du point de vue de l'émission de fluorescence avec décalage spectral et exaltation, lorsqu'elles sont étudiées dans le DMSO.

	ϵ (cm ⁻¹ .M ⁻¹)		$\lambda_{\text{max,absorption}} = \lambda_{\text{max,exc-1h\nu}}$ (nm)		$\lambda_{\text{max,émission}}$ (nm)		Quantum Yield (ϕ)		$\lambda_{\text{max,exc-2h\nu}}$ (nm)		2-photon brightness ($\sigma_{2h\nu} * \phi$)		$\sigma_{2h\nu}$	
	DMSO	TRIS	DMSO	TRIS	DMSO	TRIS	DMSO	TRIS	DMSO	TRIS	DMSO	TRIS	DMSO	TRIS
NT2	44000	21600	392	372	464	488	0.91	0.085	750	750	48	1	52.7	11.8
NT3	61400	30600	388	366	460	475	0.78	0.175	750	750	57	4.75	73.1	27.1
NT4	36300	14600	391	370	467	490	0.89	0.06	740	750	52	0.5	58.4	8.3
NT5	30000	11300	387	367	463	479	0.56	0.073	750	750	20	1	35.7	13.7
NT6	34700	16900	391	372	467	491	0.84	0.055	750	750	43	1	51.2	18.2
NT7	32700	19000	388	367	463	476	0.60	0.066	750	750	28	0.75	46.7	11.4
NT9	23000	7500	387	370	461	478	0.53	0.032	750	750	8	0.3	15.1	9.4

Tableau 1. Caractéristiques spectrophysiques des NT de deuxième génération. Les NT présentent de meilleures caractéristiques dans le DMSO que dans le Tris.

En comparant les molécules dans un même solvant, on observe des similarités pour les maximums d'absorption 1-photon (environ 390 nm dans le DMSO et 370 nm dans le Tris) et d'émission (environ 463 nm dans le DMSO et 480 nm dans le Tris). De plus, pour la majorité des molécules, les valeurs ϵ varient peu (entre 30000 et 44000 cm⁻¹.M⁻¹ dans le DMSO), sauf pour NT3 et NT9 (respectivement 61400 et 23000 cm⁻¹.M⁻¹). Les maximums d'absorption 2-photon sont les mêmes pour toutes les molécules (\approx 750 nm), qu'elles soient dans le Tris ou dans le DMSO. En revanche, les rendements quantiques de fluorescence et les sections efficaces d'absorption 2-photon diffèrent selon les molécules. D'un point de vue de la brillance 2-photon *in vitro*, les molécules NT2, NT3, NT4 et NT6 présentent les meilleures caractéristiques avec des valeurs comprises entre 43 et 57 GM dans le DMSO. Les autres molécules (NT5, NT7 et NT9) ont une brillance 2-photon en dessous de 30 GM. La présence du méthyle en terminal de la partie chromophorique des NT pairs ne semble pas apporter de modifications significatives concernant les caractéristiques spectrales des NT, même si les rendements quantiques de fluorescence (mesurés dans le DMSO) semblent plus élevés pour les NT possédant un NH-méthyle.

Stabilité des NT. La stabilité des NT dans le DMSO a été testée par des mesures spectrales. Les solutions stock ont été conservées à 10 mM à 4°C, et une mesure spectrale a été réalisée à une concentration de 5 μ M à différents temps (Figure 2). NT2, NT3 et NT6 présentent une certaine instabilité avec une importante dégradation entre le 11^{ème} et le 20^{ème} jour. NT4 est lui relativement stable et NT5, NT7 et NT9 restent très stables sur 20 jours. On peut noter, que de manière générale, les NT possédant un NH-méthyle sont moins stables que leur homologue non méthylé, à l'exception toutefois de NT3 qui est tout aussi instable que NT2. De manière générale, nous pouvons affirmer que le groupement méthyle influe sur la stabilité des molécules. De plus, NT6 semble être la moins stable des molécules, particulièrement dans les conditions de culture cellulaire. En effet, la solution de NT6 à 5 μ M dans le tampon Tris, conservée à température ambiante, présente un changement de couleur très rapide (1h après la préparation). En analysant cette solution par mesures spectrophysiques, nous avons pu mettre en évidence que ce changement de couleur était lié à la dégradation de NT6 (données non montrées). Pour ces raisons d'instabilités à l'origine d'importantes variabilités de résultats dans nos expériences cellulaires préliminaires, nous avons décidé d'exclure NT6 dans la suite de l'étude.

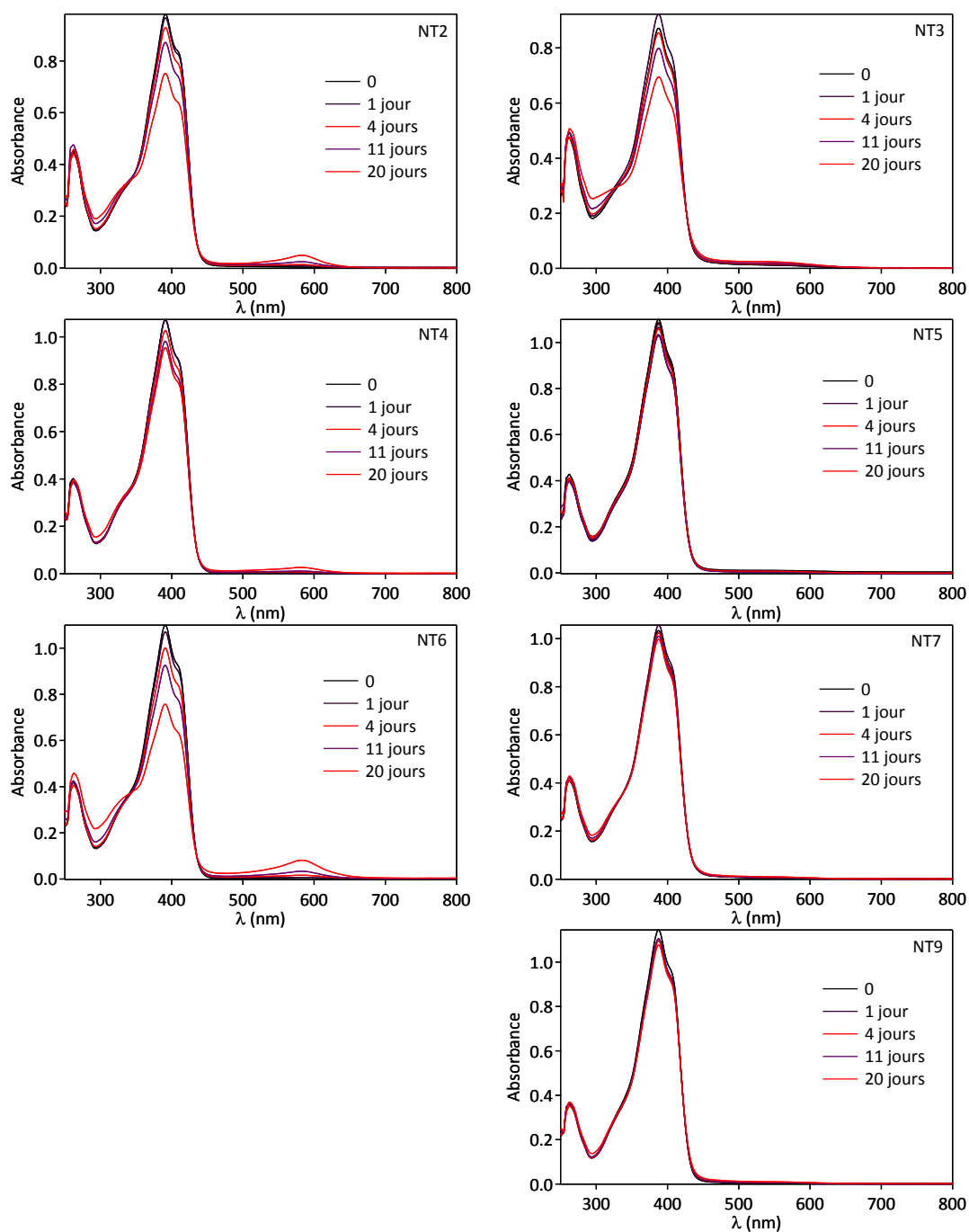


Figure 2. Stabilité des NT. Les NT ont été conservés dans le DMSO à une concentration de 10 mM à 4°C. Une mesure spectrale a été effectuée à différents temps à une concentration de NT de 5 μ M dans le DMSO. Les changements spectraux indiquent une instabilité de la molécule.

Pénétration cellulaire des NT de deuxième génération. Afin de déterminer la capacité des NT de deuxième génération à s'internaliser dans les cellules vivantes et éventuellement se fixer à la eNOS, nous avons entrepris des expériences sur des cellules endothéliales (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells) exprimant naturellement cet isoforme. Dans un premier temps, nous avons observé la fluorescence 2-photon des NT dans ces cellules

(excitation à 760 nm). Les cellules ont été imagées avant l'injection de NT, puis à différents temps d'incubation avec les NT à 5 μ M (Figure 3). Les molécules présentent des différences significatives d'intensité de fluorescence sous excitation 2-photon dans les cellules HUVEC. NT4 et NT5 présentent une intensité très importante dans les cellules HUVEC, témoignant au moins de leurs capacités à pénétrer dans ces cellules. Une plus faible intensité de fluorescence intracellulaire est détectée pour NT9 et NT2. Quant à NT3 et NT7, très peu ou pas de fluorescence intracellulaire a pu être détectée. Cette expérience met en évidence une hiérarchie de brillance 2-photon cellulaire des NT, où NT4 et NT5 sont les composés les plus brillants, tandis que les autres sont peu brillants. Il faut noter que cette hiérarchie est clairement différente de celle observée pour la brillance 2-photon *in vitro*. NT4 et NT5 possèdent une partie nucléotidique identique. La forte intensité de fluorescence de ces deux molécules dans les cellules HUVEC indique que la position de leur groupement carboxylate en 3' du ribose est au moins favorable à leur pénétration dans les cellules endothéliales. Cependant, cette expérience, seule, ne permet pas de savoir si la forte fluorescence cellulaire observée avec NT4 et NT5 est due à leur fixation sur la eNOS. Réciproquement, cette expérience ne permet pas de savoir si la faible fluorescence observée pour NT2, NT3, NT7 et NT9 est liée à des problèmes d'internalisation cellulaire de ces molécules ou à une localisation subcellulaire peu propice à leur fluorescence.

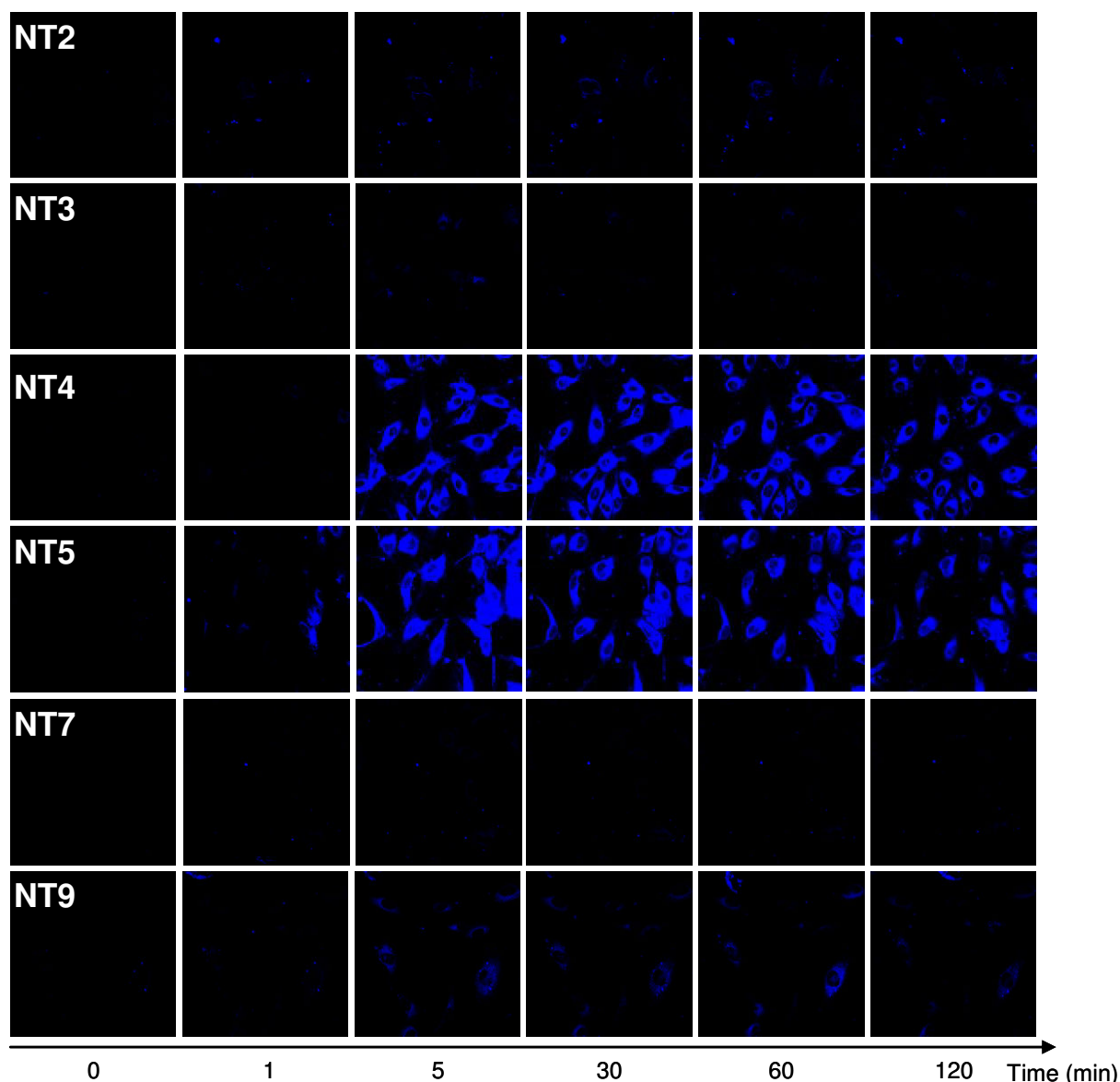


Figure 3. Incubation des cellules HUVEC avec les NT. Les cellules HUVEC ont été imagées avant l’injection de NT, puis à différents temps d’incubation de NT à 5 μ M. Les images ont été obtenues par excitation 2-photon des NT à 760 nm (émission : 450-550 nm).

Co-localisation avec l’appareil de Golgi. Afin d’appréhender la capacité des NT à se fixer à la eNOS dans les cellules endothéliales, nous avons mené des expériences de co-localisation avec l’appareil de Golgi, un organite dans lequel la protéine eNOS est exprimée¹²⁹. Dans les cellules HUVEC vivantes, l’appareil de Golgi a été imagé à l’aide d’un marqueur BODIPY TR-ceramide, dont la fluorescence est émise dans le rouge (Figure 4, ligne du milieu). Les NT sont représentés en vert (Figure 4, ligne du haut), afin de faciliter la visualisation de la superposition des fluorescences (Figure 4, *merge*). La figure 4 montre une forte co-localisation des dérivés NT4 et NT5 avec l’appareil de Golgi. Cependant, NT4 et NT5 ne semblent pas être exclusivement présents dans cet organite. NT7 et NT9 co-localisent très peu

avec l'appareil de Golgi (les points de superpositions sont négligeables par rapport à la fluorescence globale de ces NT). Quant à NT2 et NT3, ils ne se situent pas dans l'appareil de Golgi car aucune co-localisation n'est visible.

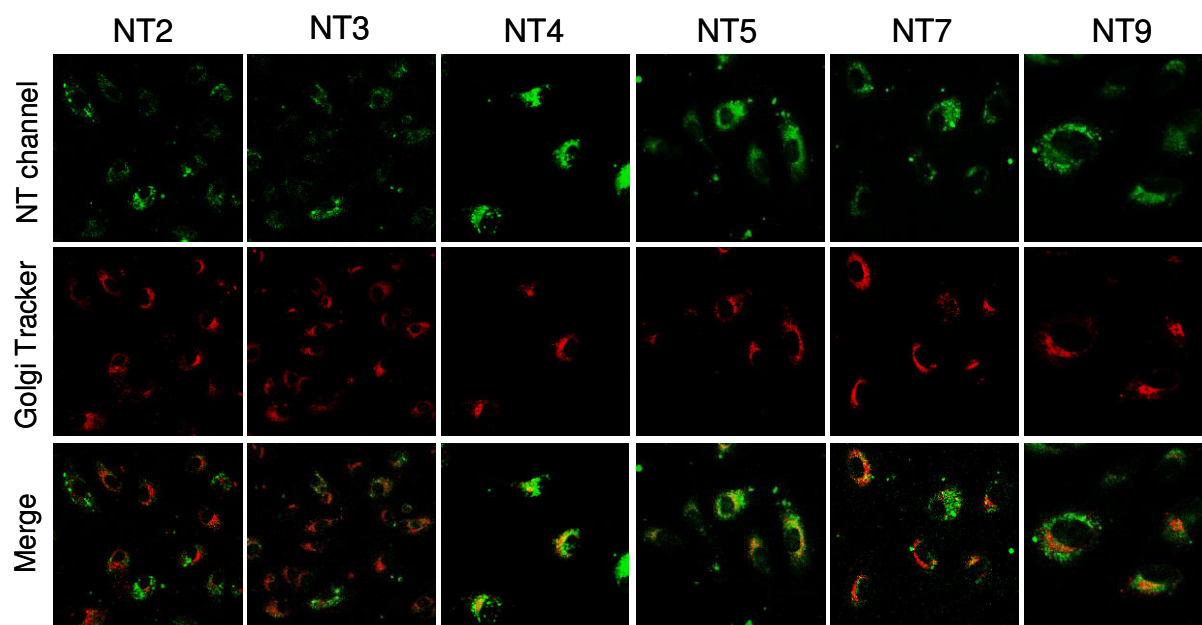


Figure 4. Co-localisation des NT avec l'appareil de Golgi. Les cellules HUVEC vivantes ont été incubées avec 5 μ M de NT pendant 2h, puis traitées pour le marquage de l'appareil de Golgi. Les NT (ligne du haut) sont représentés en vert pour faciliter la co-localisation (excitation 2-photon à 760 nm ; émission à 450-550 nm). L'appareil de Golgi (ligne du milieu) est marqué à l'aide du BODIPY TR-ceramide (excitation à 543 nm ; émission à 635-700 nm). La superposition des fluorescences (*merge*) est présentée sur la ligne du bas. Les points jaunes indiquent une co-localisation des deux molécules.

Cette expérience permet de soutenir l'hypothèse selon laquelle le groupement carboxylate en position 3' du ribose (cas de NT4 et NT5) semble favoriser la pénétration cellulaire et le ciblage des NT vers la eNOS. Des expériences de co-localisation avec un marqueur spécifique de la eNOS permettrait de confirmer cette hypothèse ; mais l'utilisation d'un anticorps ciblant la eNOS est inapplicable pour l'étude des NT, puisque ces molécules présentent une localisation cellulaire différente dans les cellules HUVEC fixées (données non montrées).

Illumination continue des NT. Les NT ont été conçus pour transmettre un électron à la NOS sous excitation lumineuse. Ainsi, le flux d'électron généré dans la NOS conduirait à la formation de NO. Une forte production intracellulaire de NO conduit à une mort cellulaire¹⁹². Afin de définir la capacité des NT à générer une production cellulaire de NO, nous avons procédé à différents tests.

Dans un premier temps, les cellules HUVEC ont été traitées avec 5 μ M de NT pendant 2h, puis illuminées en continue, sous excitation 2-photon (760 nm), pendant 15 minutes. La figure 5 présente les images des cellules avant et après illumination. Les images obtenues en DIC (*Differential Interference Contrast*) informent sur la morphologie des cellules. Après 15 minutes d'illumination, seules les cellules traitées avec NT4 et NT5 présentent de grands changements morphologiques. En effet, en comparant les images prises avant et après illumination, on note une contraction des cellules qui sont moins étalées ; mais surtout, on observe la formation de bourgeonnements membranaires (flèches bleues), un signe précoce de la mort cellulaire¹⁸². En revanche, les cellules traitées avec les autres NT ne présentent aucun changement morphologique. Les cellules contrôles non traitées aux NT mais irradiées (*without NT*) montrent que l'illumination seule n'induit aucune toxicité. Cette expérience révèle une induction de la mort cellulaire par excitation biphotonique de NT4 et NT5. Néanmoins, ces résultats ne nous permettent pas de savoir pas si cette mort cellulaire est due à une activité NOS-dépendante, *e.g.* via une production de NO, générée par la photo-activation de NT4 et NT5 ; ou si ces molécules induisent, de manière indépendante à la NOS, une formation d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Alternativement, NT4 et NT5 pourraient être à l'origine d'une formation de ROS dépendante de la NOS induite par une fuite d'électron^{193,194}.

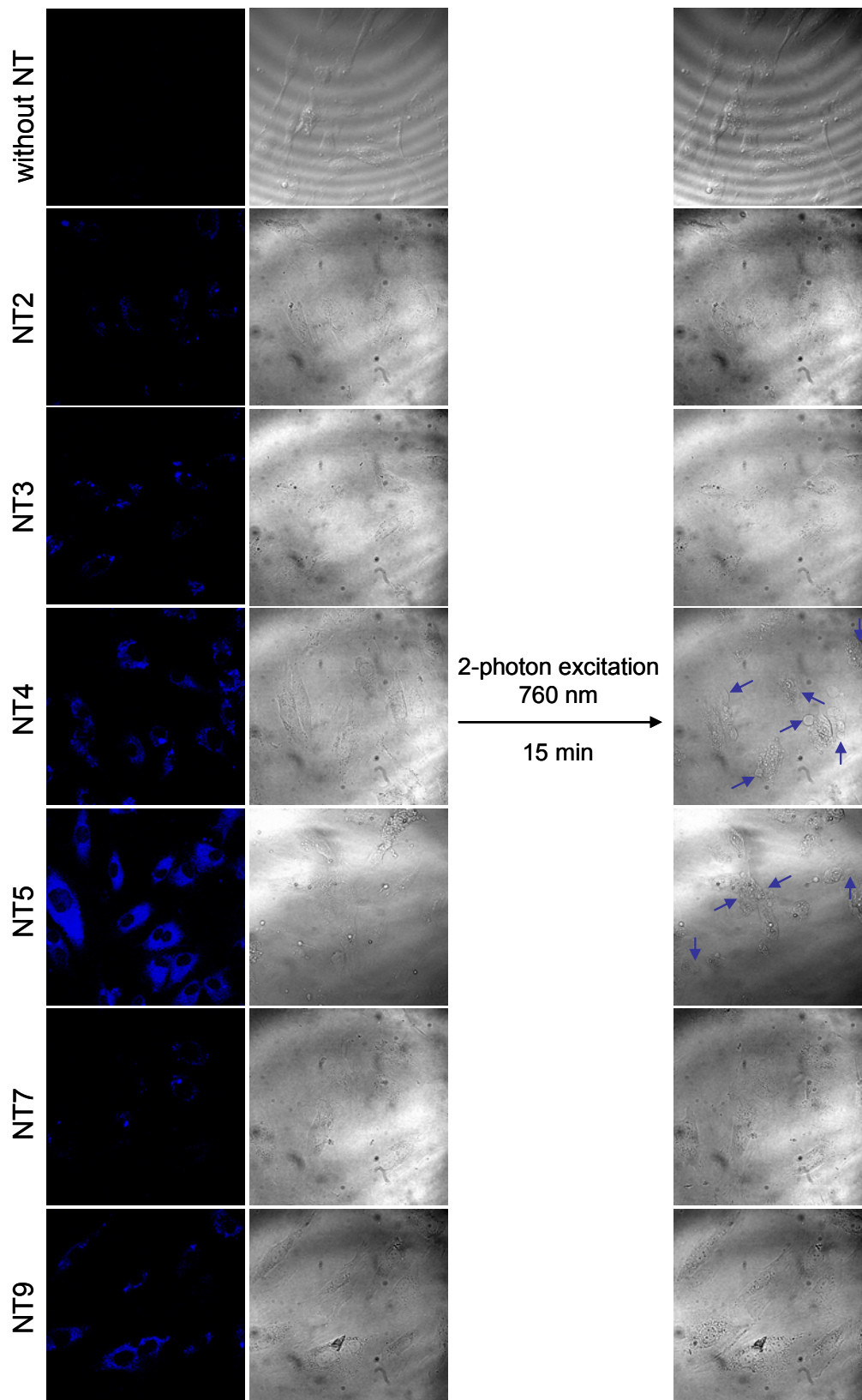


Figure 5. Illumination continue des NT. Après incubation avec 5 μM de NT pendant 2h, les cellules HUVEC ont été illuminées en continu pendant 15 min (excitation 2-photon à 760 nm ; émission à 450-550 nm). Les colonnes de gauches montrent les cellules (fluorescence et DIC) avant illumination. La colonne de droite présente les cellules après 15 min d'illumination. Les flèches bleues indiquent des bourgeonnements membranaires. Irradiance : 1,25 W/cm².

Cette expérience révèle une induction de la mort cellulaire par excitation photonique de NT4 et NT5. Néanmoins, nous ne savons pas si cette mort cellulaire est due à une production de NO générée par la photo-activation de NT4 et NT5 ; ou si ces molécules induisent, de manière indépendante à la NOS, une formation d'espèces radicalaires de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*).

Dans un second temps, nous avons voulu définir la cause de ces bourgeonnements membranaires. Nous nous sommes focalisés sur NT4 et NT5, les seules molécules induisant ces phénomènes, en prenant NT7 comme témoin négatif. Les cellules HUVEC ont été incubées avec 5 μ M de NT4, NT5 ou NT7, ensuite traitées avec différents inhibiteurs : le N-acétylcystéine (NAC) un antioxydant inhibant les ROS, le N ω -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la NOS se fixant au site de liaison de la L-arginine (domaine oxygénase), ou NS1, un autre inhibiteur de la NOS mais se fixant au site NADPH de la NOS (domaine réductase) et inhibant la formation de NO. Les cellules sont alors illuminées sous excitation 2-photon pendant 15 minutes comme précédemment. Avec le traitement par le NAC (Figure 6A) l'excitation photonique de NT4 et NT5 induit toujours un bourgeonnement membranaire (flèches bleues), ce qui indique que le NAC ne protège pas les cellules HUVEC de la mort cellulaire. Ce résultat suggère que la mort cellulaire photo-induite en présence de NT n'est certainement pas due à une production de ROS. Les traitements par L-NAME et NS1 semblent au contraire protéger les cellules HUVEC de la mort cellulaire photo-induite par l'excitation de NT4 et NT5. En effet, les cellules traitées avec L-NAME (Figure 6B) ou NS1 (Figure 6C) ne présentent pas ou très peu de changements morphologiques après 15 minutes d'illumination. De plus, des expériences réalisées sur les cellules HeLa, une lignée cellulaire cancéreuse n'exprimant pas la protéine eNOS, soutiennent ces observations (Annexe 1). Aucune fluorescence des NT n'est détectée dans ces cellules et aucun changement morphologique des cellules n'est observé après 15 minutes d'illumination. Il semble donc que la présence de la NOS soit nécessaire à la formation des bourgeonnements membranaires et que la mort cellulaire induite par la photo-activation de NT4 et NT5 soit bien eNOS-dépendante. L'inhibition de la formation des bourgeonnements membranaires par deux inhibiteurs de la NOS, l'absence d'inhibition par l'antioxydant NAC et l'absence d'effet dans les cellules HeLa (NOS⁻) indiquent clairement un effet photocytotoxique eNOS-dépendant et suggèrent très fortement que la photo-activation de NT4 et NT5 induit une production de NO, responsable de l'effet photocytotoxique.

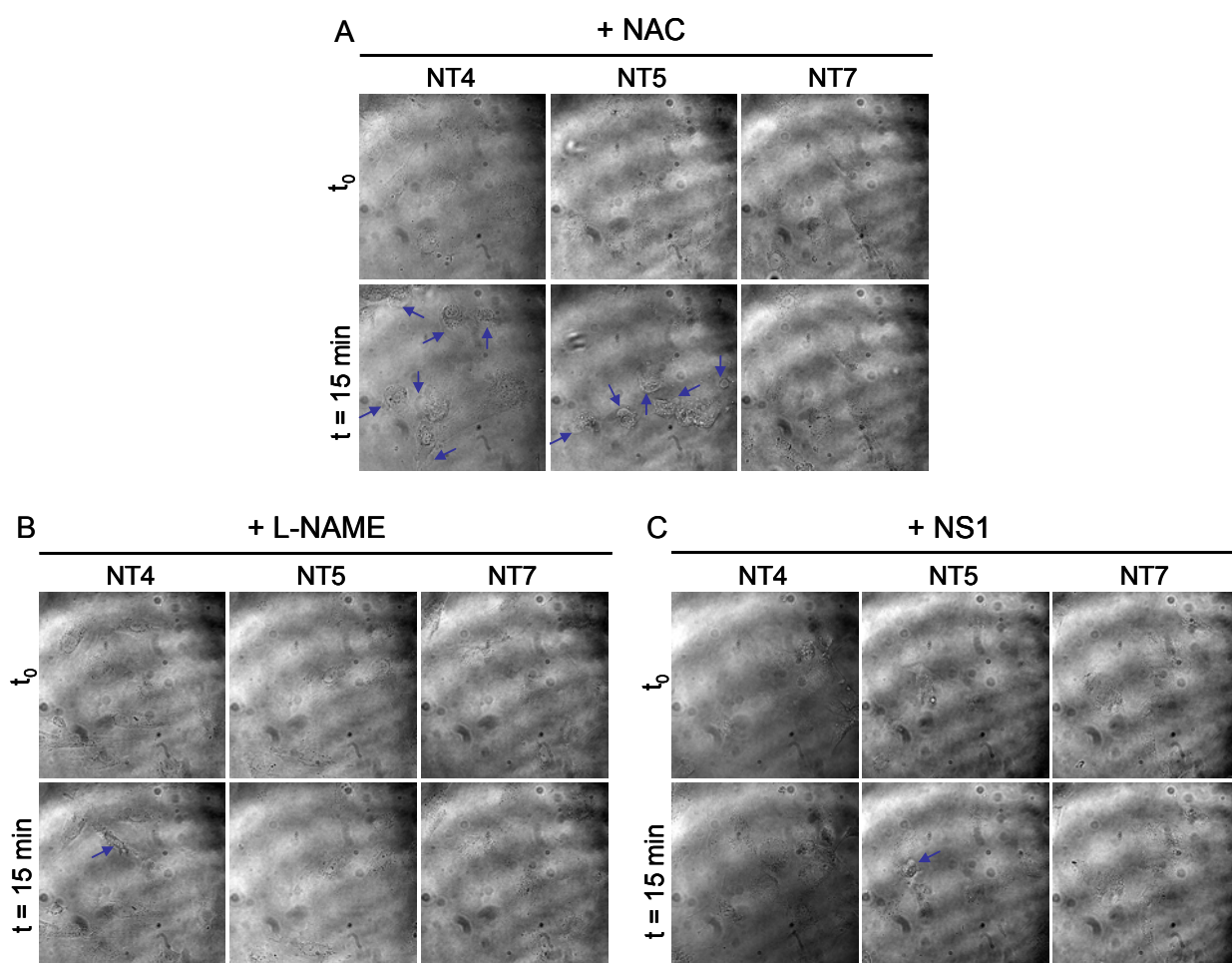


Figure 6. Effets de différents inhibiteurs sur le bourgeonnement membranaire. Les cellules HUVEC ont été incubées avec 5 μM de NT pendant 2h et traitées avec 3 mM de NAC (A), 100 μM de L-NAME (B) ou 20 μM de NS1 (C). Les cellules ont ensuite été illuminées pendant 15 min sous excitation 2-photon à 760 nm. Pour chaque expérience, la ligne du haut présente les cellules avant illumination et la ligne du bas après 15 min d'illumination. Les flèches bleues désignent les bourgeonnements membranaires. Irradiance : 1,25 W/cm².

Viabilité cellulaire. Afin de confirmer que le phénomène de bourgeonnement membranaire est bien le témoin d'une mort cellulaire, nous avons réalisé des tests de viabilité cellulaire par MTT. Les cellules ont été incubées avec NT4, NT5 ou NT7 à 3 ou 5 μM pendant 2h, puis illuminées ou non pendant 30 minutes sous excitation 1-photon à l'aide d'une lampe au xénon équipée d'un filtre à 365 nm. La figure 7 montre le pourcentage de survie cellulaire, mesuré 24h après le traitement, par rapport aux cellules non traitées. A cette puissance, l'irradiation n'a pas d'effet toxique intrinsèque sur les cellules. De plus, on voit que, sans illumination, les trois molécules ne sont pas cytotoxiques, avec un taux de survie cellulaire supérieur à 80%. En revanche, pour NT4 (Figure 7A) et NT5 (Figure 7B), en comparant le taux de survie des cellules illuminées ou non pour une même concentration, on observe une diminution significative de la survie cellulaire lorsque les cellules sont illuminées. Tandis que pour NT7

(Figure 7C), le taux de survie cellulaire ne varie pas selon que les cellules sont illuminées ou non. Les résultats de viabilité cellulaire confirment donc l'induction de la mort cellulaire spécifique par la photo-activation de NT4 et NT5.

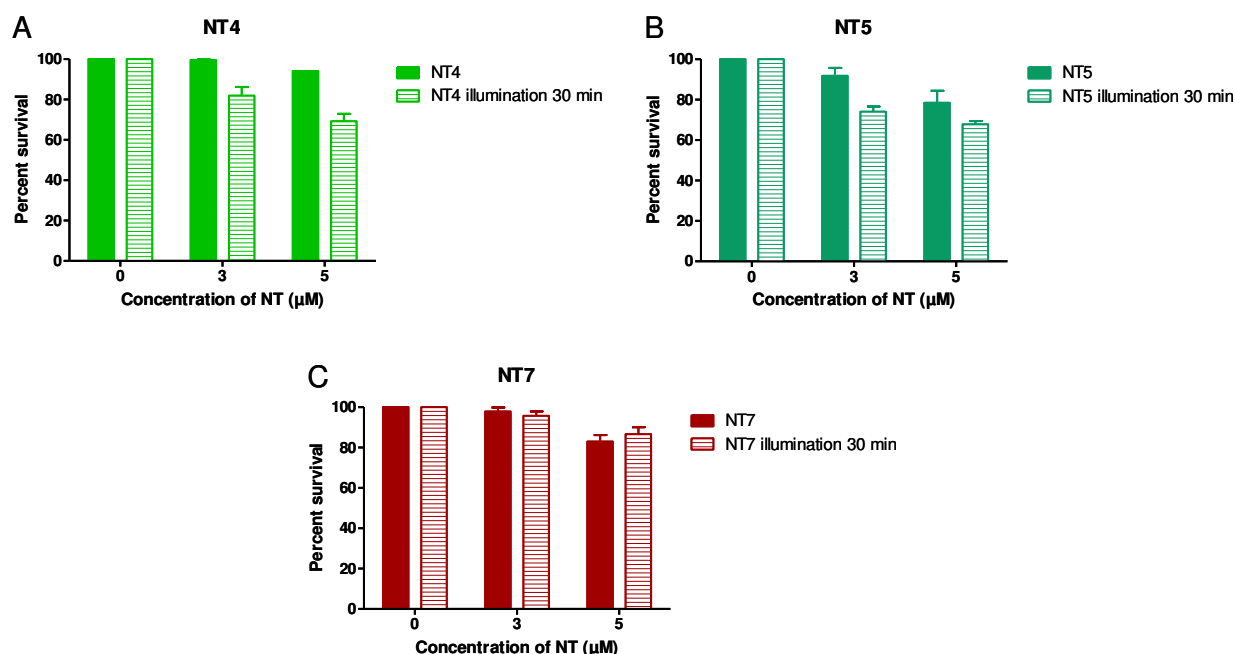


Figure 7. Viabilité des cellules traitées par les NT. Les cellules HUVEC ont été traitées avec NT4 (A), NT5 (B) et NT7 (C) à 3 ou 5 µM pendant 2h, puis illuminées ou non sous excitation 1-photon à 365 nm. Le test de viabilité par MTT a été réalisé 24h après le traitement. Le taux de survie des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées (contrôle) est reporté en fonction de la concentration de NT. Irradiance : 6,6 mW/cm².

Photoblanchiment des NT. La photostabilité intracellulaire des NT a également été déterminée en raisonnant que l'oxydation de ces molécules pourrait aboutir à une perte du signal de fluorescence. Nous avons alors mesuré l'intensité de fluorescence intracellulaire des NT sous illumination 2-photon, au cours du temps pendant 15 minutes. Les résultats de la figure 8 mettent en évidence une forte diminution de la fluorescence des NT, particulièrement pour NT5, mais aussi pour NT4, NT7 et NT9. NT2 et NT3 présentent un profil plus photostable.

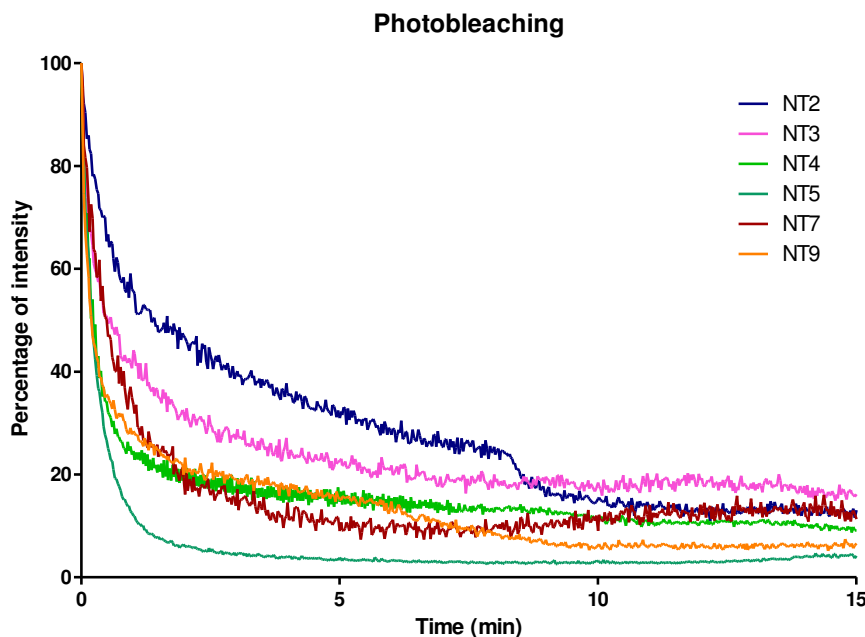


Figure 8. Mesure de l'intensité de fluorescence intracellulaire. Les cellules HUVEC ont été traitées avec 5 μM de NT pendant 2h puis illuminées sous excitation 2-photon (760 nm) pendant 15 minutes. L'intensité de fluorescence intracellulaire émise par les NT a été mesurée (émission à 450-550 nm) au cours du temps. Irradiance : 1,25 W/cm².

Comme nous l'avons précisé précédemment, les NT ont été conçus pour photo-déclencher la production de NO en initiant le transfert d'électron dans la NOS. Ce mécanisme peut expliquer une perte de fluorescence des NT au profit d'un transfert d'électron initié par la photo-activation de ces molécules. Afin de différencier ce mécanisme de photoblanchiment par transfert d'électron d'autres types de photo-dommages aboutissant eux-aussi à une perte nette du signal d'émission de fluorescence, les cinétiques de photoblanchiment de NT4, NT5, NT7 et NT9 ont été étudiées en présence d'inhibiteurs de la NOS. Les cellules HUVEC ont alors été traitées avec 5 μM de NT4, NT5, NT7 ou NT9 en présence ou non d'inhibiteur de la NOS (L-NAME ou NS1) puis illuminées en continu sous excitation 2-photon pendant 15 minutes. Pour NT4 (Figure 9A) et NT5 (Figure 9B), la diminution de la fluorescence intracellulaire est la même lorsque la molécule est incubée seule ou en présence de L-NAME. En revanche, NS1 exerce un effet protecteur vis-à-vis de la diminution de fluorescence de ces deux molécules. Par opposition, les fluorescences intracellulaires de NT7 (Figure 9C) et NT9 (Figure 9D), diminuent de la même manière quelque soit le traitement, ce qui témoigne d'une diminution de fluorescence « naturelle » ou non-spécifique de la molécule (photoblanchiment lié à un photo-dommage). Bien que tous deux soient des inhibiteurs de la NOS, NS1 et L-NAME ont des mécanismes d'inhibition différents. NS1 est compétiteur du NADPH, le donneur d'électron naturel de la NOS, et agit donc en amont de la chaîne de réaction (au

niveau du domaine réductase) en inhibant le transfert initial d'électron. NS1 doit donc être aussi compétitif des composés NT se liant à la eNOS. Alors que L-NAME, se fixe sur le site de liaison de la L-arginine dans le domaine oxygénase ; il inhibe en aval la production de NO et n'est pas compétitif des composés NT. Le fait que les effets photocytotoxiques de NT4 et NT5 soient inhibés à la fois par NS1 et L-NAME apparaît comme logique dans ce contexte, et l'effet protecteur de NS1 seulement (et non pas du L-NAME) sur le photoblanchiment de NT4 et NT5 (et non pas de NT7 et NT9 qui ne présentent pas de photocytotoxicité) démontre (i) une corrélation entre la mort cellulaire et le photoblanchiment spécifique (i.e. la part inhibée par NS1) et (ii) une oxydation de NT4 et NT5 liés à la eNOS. Ces résultats indiquent que NT4 et NT5 photo-induisent, sous excitation 2-photon, un transfert d'électron au niveau de la eNOS aboutissant à la mort cellulaire.

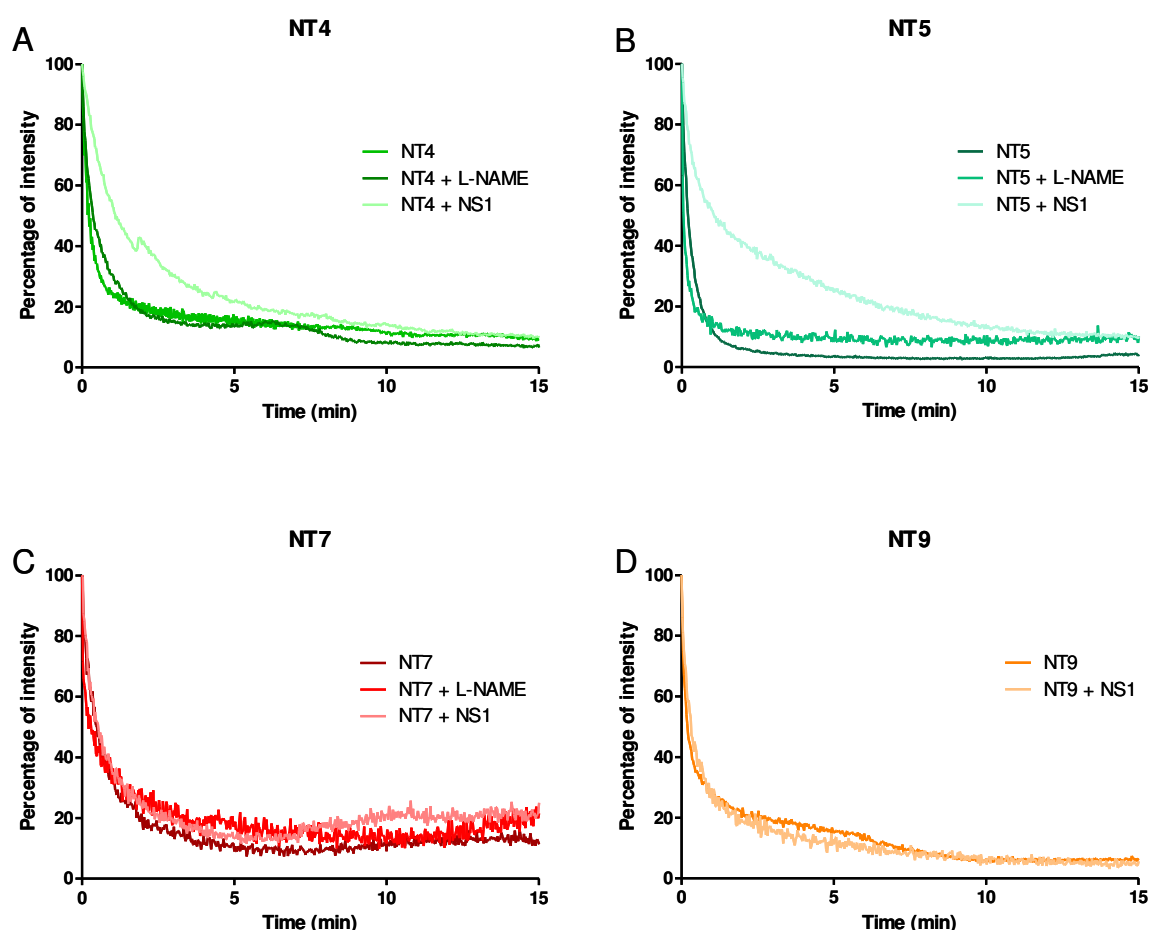


Figure 9. Influence d'inhibiteurs de la NOS sur l'intensité de fluorescence de NT. Les cellules HUVEC ont été traitées avec 5 μM de NT en présence ou non d'inhibiteur L-NAME (100 μM) ou NS1 (20 μM) ; puis illuminées sous excitation 2-photon (760 nm) pendant 15 minutes. L'intensité de fluorescence intracellulaire émise par les NT a été mesurée (émission à 450-550 nm) au cours du temps. Irradiance : 1,25 W/cm².

DISCUSSION

La chimie « click » présente de nombreux avantages pour la synthèse des NT. Elle permet d'obtenir rapidement une large gamme de molécules différentes. Cette technique a permis ici la synthèse de sept NT de deuxième génération : NT2, NT3, NT4, NT5, NT6, NT7 et NT9. Ces molécules présentent entre elles des variations de structure au niveau de leur partie chromophorique et de leur partie de reconnaissance à la NOS (nucléotidique) ; elles présentent aussi des différences de structure avec NT1, le premier Nanotrigger synthétisé^{165,169}. Principalement, le groupement phosphate de la partie nucléotidique de NT1 a été remplacé par un groupement carboxylate sur les NT de deuxième génération. Les NT de deuxième génération présentent une variation du nombre et de la position du groupement carboxylate. Ainsi, NT2 et NT3 possèdent deux groupements carboxylates sur le ribose, NT4 et NT5 possèdent un groupement carboxylate en position 3' du ribose, NT6 et NT7 possèdent un groupement carboxylate en 2' du ribose, et NT9 ne possède pas de groupement carboxylate. L'extrémité de la partie chromophorique des NT impairs est constituée d'un groupement NH₂, alors les NT pairs possèdent un NH-méthyle.

Le but de cette étude était, dans un premier temps, de vérifier que la carboxylation de la partie nucléotidique des NT de deuxième génération peut remplacer de manière efficace la phosphorylation de NT1 et, par la suite, de déterminer l'influence des variations de structure des NT de deuxième génération sur la fixation de la NOS et l'initiation du flux d'électron.

Les NT de deuxième génération présentent des caractéristiques spectrales *in vitro* intéressantes, notamment au niveau de leur absorption en 1- et 2- photon, ainsi que de leur rendement quantique de fluorescence. Certaines molécules présentent de meilleures caractéristiques, particulièrement pour la brillance 2-photon, comme NT2, NT3, NT4 et NT5. D'un point de vue chimique, les caractéristiques spectrales et la stabilité des NT sont influencées par la partie chromophorique de ces molécules. Les variations apportées sur la partie chromophorique (NH₂ ou NH-Me terminal) ne semblent pas influencer l'absorption en 1- et 2-photon ou la fluorescence *in vitro* des NT. En revanche, les NT présentant un NH-méthyle sur leur partie chromophorique sont moins stables que ceux possédant un NH₂ terminal. La molécule NT6 est chimiquement très instable, particulièrement dans les solutions aqueuses comme le tampon Tris ou le milieu extracellulaire. C'est pourquoi nous avons décidé de la soustraire des expériences cellulaires.

Au niveau cellulaire, la brillance 2-photon est différente de celle mesurée *in vitro*. Ainsi, les brillances 2-photon mesurées *in vitro* et *in cellulo* ne semblent pas corrélées. En effet, *in vitro* NT2 et NT3 présentent une brillance 2-photon élevée (respectivement 48 et 57 GM), alors que ces molécules sont très peu fluorescentes dans les cellules HUVEC. Les expériences réalisées au cours de cette étude ne nous permettent pas de déterminer si cette différence est due à une difficulté de pénétration de ces molécules dans les cellules ou à leur localisation subcellulaire peu favorable à leur fluorescence. NT4 et NT5, quant à eux, sont très fluorescents dans les cellules HUVEC alors que NT5 possède une des moins bonnes brillances 2-photon déterminées *in vitro* (20 GM).

Les expériences de co-localisation avec l'appareil de Golgi ont révélé une localisation principalement Golgienne pour NT4 et NT5, tandis que les autres molécules ne présentent pas ou très peu de co-localisation avec cet organite cellulaire (Annexe 2). L'appareil de Golgi étant l'organite cellulaire principal où se situe la eNOS¹²⁹, la localisation cellulaire de NT4 et NT5 suppose que ces molécules sont capables de se fixer à l'enzyme. De plus, la structure de la partie nucléotidique de NT4 et NT5 est identique ; ils possèdent un groupement carboxylate en position 3' du ribose. L'absence totale de groupement carboxylate ou la présence en position 2' du ribose ne permet pas d'observer de co-localisation avec l'appareil de Golgi. Ceci suggère que le carboxylate en position 3' du ribose est responsable de la fixation de NT4 et NT5 sur la eNOS. Néanmoins, des expériences biochimiques complémentaires devraient permettre de prouver la fixation directe de NT4 et NT5 sur la eNOS recombinante.

La structure des NT a été conçue pour se fixer à la NOS, au niveau du site de liaison du NADPH, et initier le flux d'électron nécessaire à la production de NO. Sous excitation 2-photon, seul NT4 et NT5 induisent un bourgeonnement membranaire, témoignant d'une mort cellulaire. Ces observations sont confirmées sous excitation 1-photon, où NT4 et NT5 provoquent une mort cellulaire photo-induite. De plus, les expériences réalisées en présence de différents inhibiteurs montrent une protection de l'effet photo-induit par NT4 et NT5 uniquement en présence d'inhibiteurs de la NOS comme L-NAME et NS1. Ceci démontre que NT4 et NT5 sont capables de générer une mort cellulaire de façon dépendante de la NOS.

D'un autre côté, les expériences de mesure de la fluorescence intracellulaire de NT4 et NT5 en présence ou non d'inhibiteurs de la NOS ont démontré leurs capacités à générer un transfert d'électron et que leurs oxydations respectives sont bien photo-dépendantes. En effet, NS1 et L-NAME inhibent la NOS suivant des mécanismes d'action différents. L-NAME se fixe au domaine oxygénase de la NOS et inhibe la production de NO mais pas le flux

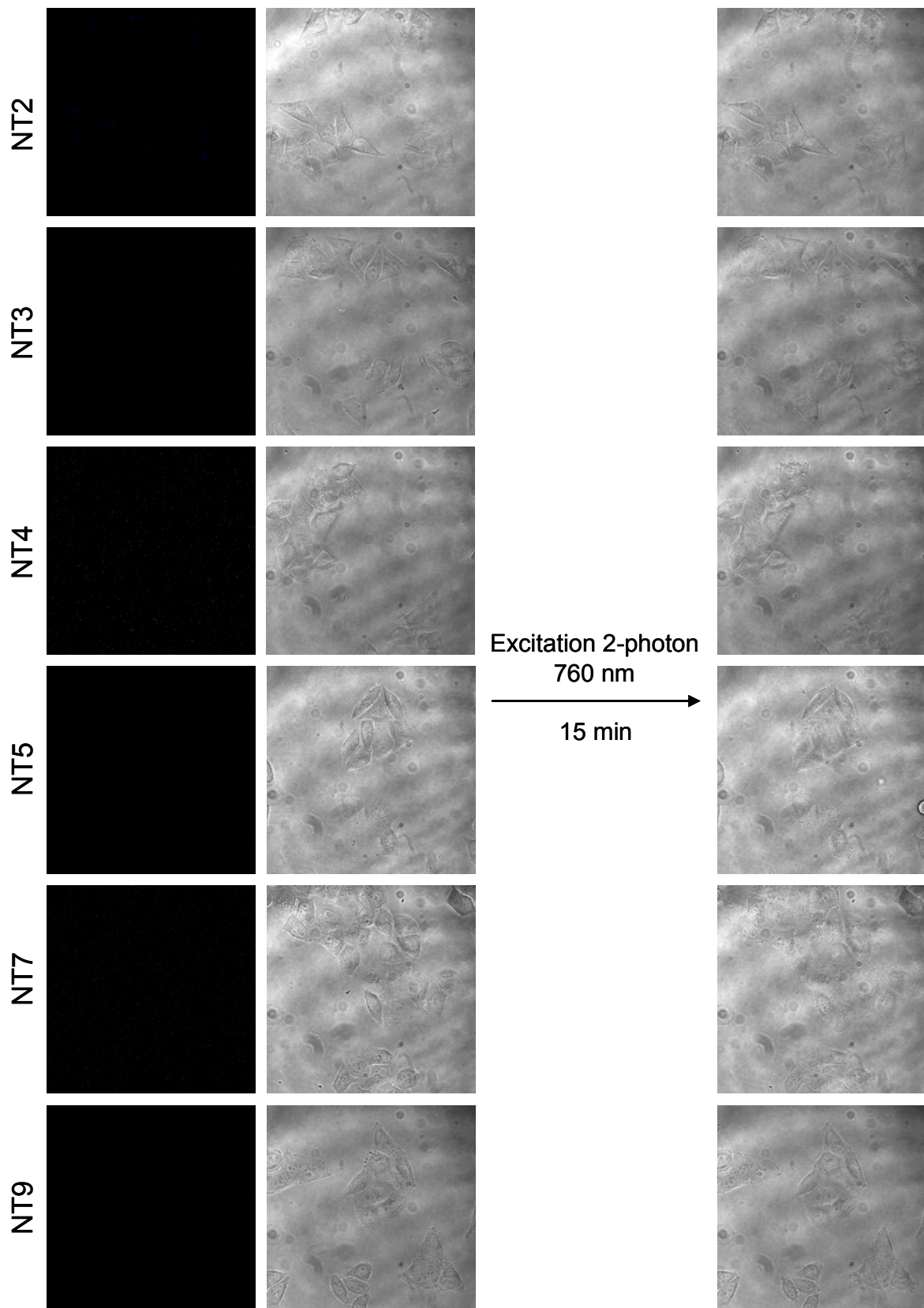
d'électron à travers la NOS. NS1 se fixe au site de liaison du NADPH dans le domaine réductase de la NOS ; de ce fait, il inhibe l'initiation du transfert d'électron à travers la NOS, et aussi la production de NO. Les résultats obtenus révèlent une protection du photoblanchiment uniquement en présence de NS1, renforçant l'idée que NT4 et NT5 sont bien oxydés par la eNOS en cellule. Cette oxydation pourrait mener à un transfert électronique non optimal (fuite électronique) menant à une formation de ROS mais l'absence de protection par le NAC suggère d'avantage que la mort cellulaire induite par NT4 et NT5 photo-activés est NO-dépendante. Toutefois, ce dernier point reste à démontrer. Des expériences de quantification de NO dans le milieu cellulaire à l'aide du réactif de Griess ou par RPE (résonance paramagnétique électronique), permettraient de mettre en évidence une production de NO (selon les quantités produites) directement médiée par la photo-activation de NT4 et NT5.

Sur l'ensemble des sept molécules étudiées, les expériences réalisées ont permis de souligner une absence de corrélation entre la brillance 2-photon *in vitro* et la brillance 2-photon *in cellulo*. En revanche, une très bonne corrélation a pu être observée concernant la brillance 2-photon *in cellulo*, la localisation subcellulaire au niveau de l'appareil de Golgi, la capacité à induire la mort cellulaire et le photoblanchiment, suggérant qu'une relation existe entre la fluorescence des dérivés NT et le ciblage de la NOS. L'absence de signal de fluorescence dans les cellules HeLa qui sont eNOS⁻, y compris avec NT4 ou NT5, est en accord avec cette relation.

Cette étude a permis d'identifier deux molécules intéressantes pour le photo-déclenchement de la production de NO médiée par la NOS : NT4 et NT5 (Annexe 2). Ces deux molécules sont capables de se fixer à la NOS et de générer un flux d'électron sous excitation 1- et 2-photon. Au regard de leur structure, il semble que la présence d'un unique groupement carboxylate en position 3' du ribose soit nécessaire et suffisante à leur fixation à la NOS cellulaire et donc à l'induction du transfert d'électron. Ces molécules pourraient présenter un grand intérêt dans le domaine biomédical, notamment grâce à leurs caractéristiques d'absorption 2-photon et leur brillance cellulaire. En effet, l'excitation 2-photon implique l'utilisation de longueurs d'onde plus pénétrantes (dans le proche infra-rouge) puisqu'elles sont moins diffusibles et moins absorbées par l'environnement tissulaire. Les NT ont été initialement conçus pour permettre un photo-contrôle de la vasodilatation des vaisseaux sanguins. De ce point de vue, la mort cellulaire observée dans de cette étude présente un inconvénient. Pour pallier ce problème, des études dose-réponse (en variant les concentrations

de NT4 et NT5 ou bien la dose de lumière d'excitation) devraient permettre de générer une production contrôlée de NO sans causer la mort cellulaire. Ceci étant, la mort cellulaire induite par la photo-activation de ces molécules permet d'envisager leur utilisation pour une thérapie photodynamique (PDT, *Photodynamic therapy*) médiée par la production de NO.

D'un point de vue moléculaire, la synthèse d'une troisième génération de NT est envisageable pour minimiser les réponses non-spécifiques. Ces molécules possèderaient un substituant supplémentaire entre les parties nucléotidique et chromophorique afin d'augmenter l'affinité et la spécificité de leur fixation à la NOS, basées sur des données de modélisation moléculaire (A. Slama-Schwok, INRA, Jouy-en-Josas, communication personnelle).



Annexe 1. Illumination continue des cellules HeLa. Les cellules HeLa ont été incubées avec $5 \mu\text{M}$ de NT pendant 2h, puis illuminées sous excitation 2-photon (760 nm) pendant 15 minutes. Les colonnes de gauche montrent les images (fluorescence et DIC) des cellules HeLa avant illumination ; et la colonne de droite montre les mêmes cellules après 15 minutes d'illumination. La fluorescence est mesurée à l'aide d'un filtre entre 450 et 550 nm. Irradiance : $1,25 \text{ W/cm}^2$.

	Hierarchy
2-photon brightness <i>in vitro</i>	NT2, NT3, NT4 > NT5, NT7 > NT9
2-photon brightness in HUVECs	NT4, NT5 > NT9 > NT2, NT3, NT7
Co-localization NT/Golgi apparatus	NT4, NT5 > NT7, NT9 > NT2, NT3
Membrane blebbing	NT4, NT5 >> NT2, NT3, NT7, NT9
Photobleaching	NT5 > NT4, NT7, NT9 > NT2, NT3

Annexe 2. Hiérarchie des NT. Le tableau ci-dessus représente un classement hiérarchique des NT suivant plusieurs critères : la brillance 2-photon *in vitro*, la brillance 2-photon dans les cellules HUVEC, la co-localisation avec l'appareil de Golgi, le bourgeonnement membranaire et le photoblanchiment.

- (1) Moncada, S. *Journal of the Royal Society of Medicine* **1999**, 92, 164-169.
- (2) Garcin, E. D.; Bruns, C. M.; Lloyd, S. J.; Hosfield, D. J.; Tiso, M.; Gachhui, R.; Stuehr, D. J.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 37918-37927.
- (3) Jáchymová, M.; Martásek, P.; Panda, S.; Roman, L. J.; Panda, M.; Shea, T. M.; Ishimura, Y.; Kim, J.-J. P.; Masters, B. S. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, 102, 15833-15838.
- (4) Bredt, D. S.; Hwang, P. M.; Glatt, C. E.; Lowenstein, C.; Reed, R. R.; Snyder, S. H. *Nature* **1991**, 351, 714-718.
- (5) Vítěček, J.; Lojek, A.; Valacchi, G.; Kubala, L. *Mediators of Inflammation* **2012**.
- (6) Raman, C. S.; Li, H.; Martásek, P.; Král, V.; Masters, B. S. S.; Poulos, T. L. *Cell* **1998**, 95, 939-950.
- (7) Li, Y.; Wang, H.; Tarus, B.; Perez, M. R.; Morellato, L.; Henry, E.; Berka, V.; Tsai, A.-L.; Ramassamy, B.; Dhimane, H.; Dessy, C.; Tauc, P.; Boucher, J.-L.; Deprez, E.; Slama-Schwok, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, 109, 12526-12531.
- (8) Rouaud, F.; Romero-Perez, M.; Wang, H.; Lobysheva, I.; Ramassamy, B.; Henry, E.; Tauc, P.; Giacchero, D.; Boucher, J.-L.; Deprez, E.; Rocchi, S. p.; Slama-Schwok, A. *Oncotarget* **2014**, 5, 10650-10664.
- (9) Velazquez, C.; Praveen Rao, P. N.; Knaus, E. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 4061-4067.
- (10) Kim, J.; Saravanakumar, G.; Choi, H. W.; Park, D.; Kim, W. J. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, 2, 341-356.
- (11) Ford, P. C. *Nitric Oxide* **2013**, 34, 56-64.
- (12) Storm, W. L.; Schoenfisch, M. H. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, 5, 4904-4912.
- (13) Sortino, S. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, 22, 301-318.
- (14) Beaumont, E.; Lambry, J.-C.; Gautier, C. m.; Robin, A.-C.; Gmouh, S.; Berka, V.; Tsai, A.-L.; Blanchard-Desce, M.; Slama-Schwok, A. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 2178-2186.
- (15) Beaumont, E.; Lambry, J.-C.; Robin, A.-C.; Martasek, P.; Blanchard-Desce, M.; Slama-Schwok, A. *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* **2008**, 9, 2325-2331.
- (16) Robin, A.-C.; Gmouh, S.; Mongin, O.; Jouikov, V.; Werts, M. H. V.; Gautier, C. m.; Slama-Schwok, A.; Blanchard-Desce, M. *Chemical Communications (Cambridge, England)* **2007**, 1334-1336.
- (17) Beaumont, E.; Lambry, J.-C.; Blanchard-Desce, M.; Martasek, P.; Panda, S. P.; van Faassen, E. E. H.; Brochon, J.-C.; Deprez, E.; Slama-Schwok, A. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* **2009**, 10, 690-701.
- (18) Lambry, J.-C.; Beaumont, E.; Tarus, B.; Blanchard-Desce, M.; Slama-Schwok, A. *Journal of molecular recognition: JMR* **2010**, 23, 379-388.
- (19) Govers, R.; Sluijs, P. v. d.; Donselaar, E. v.; Slot, J.-W.; Rabelink, T. J. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2002**, 50, 779-788.
- (20) Nguyen, N. H. *Thèse de doctorat de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan* **2015**.
- (21) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chemical Society Reviews* **2007**, 36, 1249-1262.
- (22) Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chemical Reviews* **2013**, 113, 4905-4979.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'utilisation de deux familles de molécules photo-activables pour le déclenchement de processus biologiques sous excitation 2-photon : les triphénylaminés (TPAs) et les Nanotriggers (NT) de deuxième génération. Les TPAs ont été initialement conçues pour se fixer à l'ADN et marquer le noyau en 1- et 2-photon, ce qui est le cas sur cellules fixées. Cependant, les expériences réalisées sur des cellules vivantes provenant de lignées cellulaires cancéreuses ont mis en évidence une production de ROS conduisant à la mort cellulaire, photo-induites par l'excitation de ces molécules. De manière concomitante à l'induction de la mort cellulaire, la localisation cellulaire des TPAs change sous excitation lumineuse ; les molécules se délocalisent du cytoplasme et se relocalisent dans le noyau. Ces phénomènes ont été observés pour les six TPAs étudiées sous excitation 1-photon. En revanche, seules trois molécules ont prouvé leur efficacité sous excitation 2-photon : TP2Py, TP2Bzim et TP3Bzim. La forte fluorescence de ces molécules et leur comportement cellulaire particulier confèrent une double fonction aux TPAs : elles peuvent simultanément induire et imager la mort cellulaire. En effet, les cellules traitées par les TPAs et dont la mort cellulaire a été induite par un autre agent pro-apoptotique, tel que la camptothécine, présentent un marquage nucléaire de forte intensité.

Quant aux NT, ils ont été conçus pour photo-déclencher la production de NO, sous excitation 1- ou 2-photon. Ces molécules sont constituées d'une partie chromophorique et d'une partie nucléotidique similaire à la partie de reconnaissance du NADPH sur la NOS. Le groupement phosphate de la partie nucléotidique du NADPH a été remplacé par un ou plusieurs groupements carboxylates sur les NT de deuxième génération. Parmi les sept NT de deuxième génération synthétisés par chimie « click », seules deux molécules possédant un groupement carboxylate en position 3' du ribose, ont montré une efficacité sous excitation 1- et 2-photon : NT4 et NT5. Dans des cellules endothéliales en culture (HUVEC), ces molécules sont capables de pénétrer dans les cellules, de se localiser dans l'organite cellulaire où se situe la eNOS (l'appareil de Golgi) et de déclencher un transfert d'électron sous excitation lumineuse. De façon inattendue, la photo-activation de NT4 ou NT5 déclenche la mort cellulaire de façon NOS-dépendante et probablement via la production de NO. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre directement en évidence la fixation de ces molécules sur la NOS. Des expériences biochimiques et spectroscopiques permettraient de vérifier cette condition. En effet, les mesures *in vitro* ont mis en évidence un déplacement du maximum d'émission et une exaltation de fluorescence des NT en DMSO par rapport à un tampon aqueux (Tris) ; ce qui laisse envisager la possibilité d'exploiter cette propriété spectrale pour mesurer la fixation

des NTs sur la NOS à la manière de l'étude réalisée avec le composé prototype NT1^{165,166}. Ainsi, en mesurant ces différences spectrales lors d'expériences *in vitro* sur une protéine NOS recombinante nous pourrions confirmer la fixation de NT4 et NT5 sur la NOS et déterminer la constante d'affinité de ces molécules pour la NOS. Les tests de fixation avec les autres composés NT permettraient de vérifier si les différences observées au niveau cellulaire sont dues à la propension des NT à se fixer sur la NOS, ou bien à d'autres propriétés comme leur capacité à s'internaliser dans les cellules. De plus, des expériences *in vitro* avec une NOS recombinante permettraient aussi de déterminer la quantité de NO produite par la photo-activation de NT4 et NT5 sur la NOS avant d'évaluer la quantité de NO produite au niveau cellulaire. La production de NO *in vitro* et *in cellulo* peut être mesurée par différents tests tels que le réactif de Griess ou la RPE (résonance paramagnétique électronique). La démonstration directe de production de NO au niveau cellulaire par ces méthodes dépend néanmoins de la quantité absolue de NO produit, puisque ces méthodes ne sont pas très sensibles. Le développement d'une sonde fluorescente sensible et spécifique demeure un défi^{195,196}. Alternativement, mais de façon moins directe, des marquages avec de l'arginine tritiée permettraient de vérifier que l'oxydation des NTs *in cellulo* aboutissent bien à la réaction catalysée. Les expériences réalisées ont aussi montré la photo-induction de la mort cellulaire par NT4 et NT5, probablement médiée par une production de NO. Cette induction de la mort cellulaire présente un inconvénient pour l'utilisation de NT4 et NT5 comme molécules vasodilatatrices. En effet, le NO a des effets vasodilatateurs dans l'endothélium vasculaire^{197,198}, mais il est aussi connu comme un médiateur de l'apoptose^{199,200}, selon sa concentration cellulaire. Il est donc nécessaire d'évaluer les effets dose-réponse de ces molécules, afin de déterminer la concentration de ces molécules et la dose de lumière administrée suffisantes pour générer une production de NO sans causer de mort cellulaire.

Il serait ensuite intéressant d'évaluer les effets et l'efficacité de ces molécules à des échelles supérieures, notamment l'échelle tissulaire dans un premier temps. Pour les NT, des expériences sur des segments d'aorte isolés, telles que réalisées pour NS1¹⁶³, permettraient de définir leur capacité à photo-induire la vasodilatation. De plus, l'utilisation de tissus exprimant d'autres isoformes de la NOS, comme certaines parties du foie exprimant la iNOS de manière constitutive⁸⁵, permettraient de déterminer la sélectivité de la fixation des NT sur les NOS. Il serait également intéressant d'évaluer la sélectivité vis-à-vis d'autres protéines comportant des sites de fixation au NADPH, comme la NADPH oxydase (NOX). Le cas échéant, la spécificité de la fixation des NT sur les isoformes de la NOS peut être renforcée par l'ajout d'un groupement chimique supplémentaire, qui augmenterait l'affinité de ces NT

de troisième génération pour la eNOS. Des données de modélisation moléculaire du Dr Anny Slama-Schwok (INRA, Jouy-en-Josas, communication personnelle) ont souligné les interactions de ce groupement supplémentaire avec les résidus de la eNOS, notamment un résidu arginine et un résidu thréonine, permettant au NT de se fixer à la protéine avec une meilleure affinité et une conformation optimale au transfert d'électron. Pour les TPAs, des études sur des tranches de tissus cancéreux et sains permettraient de déterminer la sélectivité des molécules pour des tissus spécifiques. Si ces molécules ne présentent aucune ou peu de spécificité tissulaire, nous pouvons envisager de les vectoriser. Des molécules vectrices, telles que l'acide folique ou le mannose, peuvent être greffées sur le cycle phényle libre des TPAs possédant deux branches vinyliques (TP2). Les TPAs vectorisées devraient s'internaliser préférentiellement dans les cellules cancéreuses surexprimant les récepteurs membranaires de ces molécules. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, les cellules cancéreuses surexpriment certains récepteurs à la surface de leur membrane plasmique, tels que les lectines ou les récepteurs de l'acide folique et de la transferrine. Les ligands de ces récepteurs font l'objet de plusieurs études de vectorisation de molécules de la PDT, par ciblage actif^{50,201}. Cependant, la vectorisation des TPAs ne peut garantir ni la conservation de leur localisation subcellulaire, ni leur efficacité à photo-induire la mort cellulaire. Des expériences cellulaires et tissulaires auront aussi pour objectif de vérifier la conservation de ces caractéristiques photophysiques et cellulaires.

Dans un second temps, il faudrait étudier le comportement de ces molécules dans un organisme entier (animal). Le but principal de l'étude *in vivo* serait d'évaluer l'action thérapeutique des molécules, c'est-à-dire de déterminer la dose minimale de molécules et de lumière nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique et la dose maximale non toxique pour l'organisme. Ces mesures devront prendre en compte l'effet direct causé par la photo-activation des molécules, mais aussi les effets indirects. Pour les NT, l'effet direct serait la vasodilatation médiée par une production de NO. Toutefois, le NO peut réagir avec l'ion superoxyde pour former le peroxynitrite, un agent oxydant puissant. Le peroxynitrite a un rôle très controversé. Dans des conditions physiologiques, il a une fonction protectrice de l'endothélium vasculaire ; alors que de fortes concentrations de peroxynitrite induit des dommages au niveau de l'endothélium vasculaire et du myocarde²⁰². Il est évident que des études dose-réponse devront être entreprises pour contrôler les effets bénéfiques par rapport aux effets toxiques non-spécifiques, y compris les effets apoptotiques mis en évidence dans nos études cellulaires.

Pour les TPAs, nous avons mis en évidence une photo-induction de l'apoptose avec une évolution différente selon les molécules. Les TP2 présentent une évolution de l'apoptose tardive/nécrose plus rapide que leurs homologues 3-branches (TP3). Cette différence peut avoir des conséquences sur le mode d'élimination des cellules mortes et le type de réaction immunitaire engendrée²⁰³. Les cellules en apoptose précoce ou en apoptose tardive, ainsi que les corps apoptotiques présentent à leur surface des molécules initialement intracellulaires interagissant avec les macrophages environnants²⁰⁴. Ces interactions provoquent une réaction immunitaire anti-tumorale conduisant à la phagocytose des cellules et corps apoptotiques par les macrophages de la tumeur (principalement de type M2). La nécrose induite par la PDT implique une destruction de la membrane plasmique et un relargage de molécules pro-inflammatoires (cytokines et chimiokines) dans le milieu extracellulaire, telles que l'interleukine 6 (IL6) et les protéines MIP1 et MIP2 (*macrophage inflammatory protein 1 and 2*)²⁰⁵. Ces molécules pro-inflammatoires agissent comme des chimioattractants ; elles attirent les cellules immunitaires circulantes (neutrophiles, monocytes et mastocytes) vers la tumeur nécrotique et induisent une réaction inflammatoire. De plus, les cellules nécrotiques sont reconnues et digérées par les cellules présentatrices d'antigènes environnantes²⁰⁶ (cellules dendritiques). Les cellules dendritiques phagocytent les cellules nécrotiques et présentent à leur surface des antigènes permettant l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺)²⁰⁷. Des études ayant évalué la relation entre le type de mort des cellules tumorales et l'efficacité de l'induction d'une réponse immunitaire *in cellulo* et *in vivo* présentent des avis divergents. Certains présentent l'apoptose comme un moyen plus efficace pour induire une réponse immunitaire anti-tumorale dû à l'effet anti-inflammatoire médié notamment par TGF- β ^{208,209}, ainsi qu'à la phagocytose par les macrophages de type M2, connus comme étant les plus efficaces pour éliminer les cellules en apoptose précoce²¹⁰. Dans ce cas, les TP3 représentent les meilleurs candidats pour la PDT puisqu'ils induisent uniquement de l'apoptose précoce. D'autres recherches montrent que la nécrose est plus efficace pour la destruction tumorale due à l'activation des lymphocytes T cytotoxiques par les cellules dendritiques. En effet, les lymphocytes T cytotoxiques matures sont capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales résiduelles, attribuant un effet « vaccinant » à la nécrose tumorale^{211,212}. Ainsi, les TP2 présentent, de ce point de vue, un avantage pour leur utilisation en PDT puisqu'elles induisent principalement de l'apoptose précoce mais aussi très probablement une part de nécrose.

De plus, des expériences *in vivo* permettraient de définir la cinétique des molécules dans l'organisme ainsi que leur tolérance et leur toxicité chez l'animal ; mais aussi le mode et la cinétique de clairance, c'est-à-dire la capacité d'épuration de ces molécules par l'organisme. Certaines molécules thérapeutiques sont mal éliminées par l'organisme, s'accumulent au niveau des reins et du foie et provoquent des insuffisances rénales et hépatiques²¹³⁻²¹⁵. Les TPAs et les NT étant des molécules photo-activables, il faudrait déterminer leurs localisations préférentielles et résiduelles dans les différents tissus et organes, afin de limiter la photosensibilité des sujets traités par ces molécules. Certaines molécules photoactivables utilisées cliniquement s'accumulent fortement dans les tissus à forte croissance cellulaire, tels que la peau, astreignant les patients à plusieurs jours ou semaines d'obscurité²¹⁶.

L'intérêt majeur des TPAs et des NT est leur forte absorption 2-photon. En effet, l'excitation 2-photon présente un grand avantage pour le traitement de maladies superficielles : les longueurs d'onde pénétrantes (infrarouge) permettent d'atteindre les couches plus profondes de l'épiderme. Les puissances de lasers et les fluences utilisées pour l'étude *in cellulo* de ces deux familles de molécules laissent présager une application possible pour le traitement de la peau. Les valeurs de puissance et de fluence utilisées lors de ces études (entre 150 et 750 J/cm²) sont compatibles avec les valeurs non-invasives utilisées lors d'études *in vivo*²¹⁷⁻²¹⁹.

Le traitement de maladies touchant les organes en profondeur nécessite l'utilisation de fibres optiques pour l'excitation lumineuse. La conception de fibres optiques pour l'excitation 2-photon est complexe, due à une difficulté de conservation de l'aspect pulsé du faisceau laser (nécessaire à une excitation 2-photon) le long de la fibre optique. Toutefois, quelques équipes de chercheurs s'intéressent à la conception de fibres optiques 2-photon permettant une excitation et une imagerie de la fluorescence. Kim *et al.* ont mis en place des faisceaux de fibres optiques d'une longueur de 15 mm, constituées de lentilles à gradient d'indice reliés à un laser 2-photon (Ti :Sapphire, 780-920 nm). Ce montage a permis d'imager en fluorescence des vaisseaux sanguins d'une souris anesthésiée²²⁰. Plus récemment, d'autres stratégies de montage ont été élaborées, telles que la conception d'une fibre optique de 2 m de longueur, en amont de laquelle sont disposé un laser pulsé (Ti:Sapphire, 80 MHz, 70 fs) et un système de pré-compensation constitué d'une paire de grisme spécifique²²¹. Dhakal *et al.* ont également confectionné un faisceau de fibre optique ultrarapide (200 fs, 76 MHz, 800-900 nm) ayant permis une stimulation optogénétique *in vivo*, dans des cellules neuronales de la souris²²².

Les TPAs et les NT ont été conçus pour des applications thérapeutiques différentes. Cependant, ces deux familles de molécules présentent une utilité dans le traitement contre le cancer. En effet, le développement tumoral induit une néoangiogénèse nécessaire à ce développement et à l'irrigation de la tumeur. Les nouveaux vaisseaux sanguins sont formés de manière désorganisée et déstructurée ; les cellules cancéreuses continuent de proliférer autour des néo-vaisseaux, induisant une compression de ces derniers. Cette structure particulière entraîne une limite pour les traitements par chimiothérapie, puisque les molécules thérapeutiques circulent difficilement dans ces néo-vaisseaux. Un traitement préalable des vaisseaux tumoraux par les NT permettrait de photo-déclencher leur dilatation, ce qui faciliterait l'accès de ces régions de la tumeur aux molécules thérapeutiques. Dans cette conception, les NTs joueraient le rôle d'adjuvants aux traitements par chimiothérapie.

De plus, la PDT a un effet anti-vasculaire induit par des dommages des cellules endothéliales²²³. Ces dommages causés au niveau de l'endothélium vasculaire conduit à une diminution de NO et à la libération de thromboxane par les cellules endothéliales provoquant, respectivement, une vasoconstriction et une agrégation plaquettaire dans les vaisseaux tumoraux²²⁴. La formation de thrombi et la vasoconstriction conduisent à un collapsus vasculaire et un arrêt du flux sanguin causant une hypoxie de la tumeur nécessaire à sa destruction^{225,226}. Il a été démontré que NS1 permet d'inhiber la formation de NO dans les tissus vasculaires¹⁶³. Il est donc envisageable d'expérimenter une combinaison de traitements par les TPAs puis par NS1, afin d'accélérer l'hypoxie et donc la destruction de la tumeur.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Patterson, G.; Davidson, M.; Manley, S.; Lippincott-Schwartz, J. *Annual review of physical chemistry*, **61**, 345-367.
- (2) Mroz, P.; Bhaumik, J.; Dogutan, D. K.; Aly, Z.; Kamal, Z.; Khalid, L.; Kee, H. L.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S.; Hamblin, M. R. *Cancer Letters* **2009**, *282*, 63-76.
- (3) Imlay, J. *Nature Reviews Microbiology* **2013**, 443-454.
- (4) DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, 351-371.
- (5) Davies, M. J. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 17-25.
- (6) Korytowski, W.; Zareba, M.; Girotti, A. W. *Chemical Research in Toxicology* **2000**, *13*, 1265-1274.
- (7) Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.-L. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41*, 1075-1083.
- (8) Kapp, T.; Müller, S.; Gust, R. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 560-564.
- (9) Endo, T.; Kimura, O.; Sakata, M. *Toxicology* **2000**, *146*, 187-195.
- (10) Roberts, J. D.; Peroutka, J.; Beggiolin, G.; Manzotti, C.; Piazzoni, L.; Farrell, N. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1999**, *77*, 47-50.
- (11) Savill, J.; Fadok, V. *Nature* **2000**, *407*, 784-788.
- (12) Alnemri, E. S.; Livingston, D. J.; Nicholson, D. W.; Salvesen, G.; Thornberry, N. A.; Wong, W. W.; Yuan, J. *Cell* **1996**, *87*, 171.
- (13) Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. *Science* **1998**, *281*, 1305-1308.
- (14) Berg, D.; Lehne, M.; MÃ¼ller, N.; Siegmund, D.; MÃ¼nkel, S.; Sebald, W.; Pfizenmaier, K.; Wajant, H. *Cell Death & Differentiation* **2007**, *14*, 2021-2034.
- (15) Li, J.; Yuan, J. *Oncogene* **2008**, *27*, 6194-6206.
- (16) Wajant, H. *Science* **2002**, *296*, 1635-1636.
- (17) Watanabe, N.; Kuriyama, H.; Sone, H.; Neda, H.; Yamauchi, N.; Maeda, M.; Niitsu, Y. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 10262-10266.
- (18) LeBlanc, H.; Lawrence, D.; Varfolomeev, E.; Totpal, K.; Morlan, J.; Schow, P.; Fong, S.; Schwall, R.; Sinicropi, D.; Ashkenazi, A. *Nature Medicine* **2002**, *8*, 274-281.
- (19) H. Hsu, J. X., D.V. Goeddel *Cell* **1995**, *81*, 495-504.
- (20) Schneider-Brachert, W.; Tchikov, V.; Neumeyer, J.; Jakob, M.; Winoto-Morbach, S.; Held-Feindt, J.; Heinrich, M.; Merkel, O.; Ehrenschröder, M.; Adam, D.; Mentlein, R.; Kabelitz, D.; SchÃ¼tze, S. *Immunity* **2004**, *21*, 415-428.
- (21) Qian, J.; Wang, D.; Cai, F.; Zhan, Q.; Wang, Y.; He, S. *Biomaterials* **2012**, *33*, 4851-4860.
- (22) Joza, N.; Susin, S. A.; Daugas, E.; Stanford, W. L.; Cho, S. K.; Li, C. Y. J.; Sasaki, T.; Elia, A. J.; Cheng, H. Y. M.; Ravagnan, L.; Ferri, K. F.; Zamzami, N.; Wakeham, A.; Hakem, R.; Yoshida, H.; Kong, Y.-Y.; Mak, T. W.; ZÃ©igang-PfÃ¼cker, J. C.; Kroemer, G.; Penninger, J. M. *Nature* **2001**, *410*, 549-554.
- (23) Tait, S. W. G.; Green, D. R. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*, 621-632.
- (24) Wei, M. C.; Lindsten, T.; Mootha, V. K.; Weiler, S.; Gross, A.; Ashiya, M.; Thompson, C. B.; Korsmeyer, S. J. *Genes & Development* **2000**, *14*, 2060-2071.
- (25) Coleman, M. L.; Sahai, E. A.; Yeo, M.; Bosch, M.; Dewar, A.; Olson, M. F. *Nature Cell Biology* **2001**, *3*, 339-345.
- (26) Sakahira, H.; Enari, M.; Nagata, S. *Nature* **1998**, *391*, 96-99.
- (27) E. Fujita, J. E., K. Urase, K. Kuida, T. Momoi *Cell Death & Differentiation* **2001**, *8*, 335-344.
- (28) Tsujimoto, Y.; Nakagawa, T.; Shimizu, S. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2006**, *1757*, 1297-1300.
- (29) Skulachev, V. P. *Apoptosis* **2006**, *11*, 473-485.

- (30) Chen, Q.; Lesnefsky, E. J. *Free Radical Biology and Medicine* **2006**, *40*, 976-982.
- (31) Devin, A.; Cook, A.; Lin, Y.; Rodriguez, Y.; Kelliher, M.; Liu, Z.-g. *Immunity* **2000**, *12*, 419-429.
- (32) Alano, C. C.; Ying, W.; Swanson, R. A. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 18895-18902.
- (33) Xu, Y.; Huang, S.; Liu, Z.-G.; Han, J. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 8788-8795.
- (34) Vandenabeele, P.; Galluzzi, L.; Vanden Berghe, T.; Kroemer, G. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*, 700-714.
- (35) Rudel, T.; Kepp, O.; Kozjak-Pavlovic, V. *Nature Reviews Microbiology* **2010**, *8*, 693-705.
- (36) Fabris, C.; Valduga, G.; Miotto, G.; Borsetto, L.; Jori, G.; Garbisa, S.; Reddi, E. *Cancer Research* **2001**, *61*, 7495-7500.
- (37) Reiners, J. J.; Caruso, J. A.; Mathieu, P.; Chelladurai, B.; Yin, X.-M.; Kessel, D. *Cell Death and Differentiation* **2002**, *9*, 934-944.
- (38) Dougherty, T. J. *Seminars in Surgical Oncology* **1986**, *2*, 24-37.
- (39) Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K. *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 380-387.
- (40) Allison, R. R. *Future Oncology (London, England)* **2014**, *10*, 123-124.
- (41) Calzavara-Pinton, P. G.; Venturini, M.; Sala, R. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2007**, *21*, 293-302.
- (42) Gaullier, J.-M.; Berg, K.; Peng, Q.; Anholt, H.; Selbo, P. I. K.; Ma, L.-W.; Moan, J. *Cancer Research* **1997**, *57*, 1481-1486.
- (43) Uehlinger, P.; Zellweger, M.; WagniÃres, G.; Juillerat-Jeanneret, L.; van den Bergh, H.; Lange, N. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* **2000**, *54*, 72-80.
- (44) Gederaas, O. A.; Holroyd, A.; Brown, S. B.; Vernon, D.; Moan, J.; Berg, K. *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *73*, 164-169.
- (45) Jiang, F.; Lilge, L.; Grenier, J.; Li, Y.; Wilson, M. D.; Chopp, M. *Lasers in Surgery and Medicine* **1998**, *22*, 74-80.
- (46) Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, C. I.; Viriot, M.-L.; Guillemin, F. o.; Barberi-Heyob, M. *Trends in Biotechnology* **2008**, *26*, 612-621.
- (47) Bhatti, M.; Yahioğlu, G.; Milgrom, L. R.; Garcia-Maya, M.; Chester, K. A.; Deonarain, M. P. *International Journal of Cancer* **2008**, *122*, 1155-1163.
- (48) Yang, L.; Mao, H.; Wang, Y. A.; Cao, Z.; Peng, X.; Wang, X.; Duan, H.; Ni, C.; Yuan, Q.; Adams, G.; Smith, M. Q.; Wood, W. C.; Gao, X.; Nie, S. *Small* **2009**, *5*, 235-243.
- (49) Schneider, R. I.; Schmitt, F. d. r.; Frochot, C. I.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemin, F. o.; MÃller, J.-F. o.; Barberi-Heyob, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 2799-2808.
- (50) Bonneau, S. p.; MorliÃre, P.; Brault, D. *Biochemical Pharmacology* **2004**, *68*, 1443-1452.
- (51) Schmidt-Erfurth, U.; Diddens, H.; Birngruber, R.; Hasan, T. *British Journal of Cancer* **1997**, *75*, 54-61.
- (52) Song, L.; Li, H.; Sunar, U.; Chen, J.; Corbin, I.; Yodh, A. G.; Zheng, G. *International Journal of Nanomedicine* **2007**, *2*, 767-774.
- (53) Gijssens, A.; Missiaen, L.; Merlevede, W.; Witte, P. d. *Cancer Research* **2000**, *60*, 2197-2202.

- (54) Amessou, M.; Carrez, D. I.; Patin, D.; Sarr, M.; Grierson, D. S.; Croisy, A.; Tedesco, A. C.; Maillard, P.; Johannes, L. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 532-538.
- (55) Idris, N. M.; Gnanasammandhan, M. K.; Zhang, J.; Ho, P. C.; Mahendran, R.; Zhang, Y. *Nature Medicine* **2012**, *18*, 1580-1585.
- (56) Park, Y. I.; Kim, H. M.; Kim, J. H.; Moon, K. C.; Yoo, B.; Lee, K. T.; Lee, N.; Choi, Y.; Park, W.; Ling, D.; Na, K.; Moon, W. K.; Choi, S. H.; Park, H. S.; Yoon, S.-Y.; Suh, Y. D.; Lee, S. H.; Hyeon, T. *Advanced Materials* **2012**, *24*, 5755-5761.
- (57) Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z. *Theranostics* **2013**, *3*, 317-330.
- (58) Ogawa, K.; Kobuke, Y. *BioMed Research International* **2013**.
- (59) Gallavardin, T.; Maurin, M.; Marotte, S.; Simon, T.; Gabudean, A.-M.; Bretonnière, Y.; Lindgren, M.; Lerouge, F.; Baldeck, P. L.; Stéphan, O.; Leverrier, Y.; Marvel, J.; Parola, S.; Maury, O.; Andraud, C. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10*, 1216-1225.
- (60) Navarro, J. R. G.; Lerouge, F.; Ceperaga, C.; Micouin, G.; Favier, A.; Chateau, D.; Charreyre, M.-T.; Lanoë, P.-H.; Monnereau, C.; Chaput, F. *Biomaterials* **2013**, *34*, 8344-8351.
- (61) Zou, Q.; Fang, Y.; Zhao, Y.; Zhao, H.; Wang, Y.; Gu, Y.; Wu, F. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 5288-5294.
- (62) Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. *Hypertension* **1988**, *12*, 365-372.
- (63) Andrade, S. P.; Bakhle, Y. S.; Hart, I.; Piper, P. J. *British Journal of Cancer* **1992**, *66*, 821-826.
- (64) Radomski, M. W.; Palmer, R. M. J.; Moncada, S. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**, *148*, 1482-1489.
- (65) Radomski, M. W.; Palmer, R. M.; Moncada, S. *Lancet (London, England)* **1987**, *2*, 1057-1058.
- (66) Vidal, M. J.; Romero, J. C.; Vanhoutte, P. M. *European Journal of Pharmacology* **1988**, *149*, 401-402.
- (67) Sinzinger, H.; Fitscha, P.; O'Grady, J.; Rauscha, F.; Rogatti, W.; Vane, J. R. *Lancet (London, England)* **1990**, *335*, 627-628.
- (68) Michel, T.; Feron, O. *Journal of Clinical Investigation* **1997**, *100*, 2146-2152.
- (69) Daff, S. *Nitric Oxide*, *23*, 1-11.
- (70) Brecht, D. S.; Hwang, P. M.; Glatt, C. E.; Lowenstein, C.; Reed, R. R.; Snyder, S. H. *Nature* **1991**, *351*, 714-718.
- (71) Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. *Biochemical Journal* **2001**, *357*, 593-615.
- (72) Brecht, D. S.; Snyder, S. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, *87*, 682-685.
- (73) Stuehr, D. J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1999**, *1411*, 217-230.
- (74) Feng, C.; Tollin, G.; Holliday, M. A.; Thomas, C.; Salerno, J. C.; Enemark, J. H.; Ghosh, D. K. *Biochemistry* **2006**, *45*, 6354-6362.
- (75) Garcin, E. D.; Bruns, C. M.; Lloyd, S. J.; Hosfield, D. J.; Tiso, M.; Gachhui, R.; Stuehr, D. J.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 37918-37927.
- (76) Welland, A.; Garnaud, P. E.; Kitamura, M.; Miles, C. S.; Daff, S. *Biochemistry* **2008**, *47*, 9771-9780.
- (77) Matsuda, H.; Iyanagi, T. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1999**, *1473*, 345-355.
- (78) Knight, K.; Scrutton, N. S. *The Biochemical Journal* **2002**, *367*, 19-30.
- (79) Chen, P.-F.; Wu, K. K. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 13155-13163.

- (80) Roman, L. J.; MartÅ;sek, P.; Miller, R. T.; Harris, D. E.; de La Garza, M. A.; Shea, T. M.; Kim, J. J.; Masters, B. S. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 29225-29232.
- (81) Feng, C.; Tollin, G.; Hazzard, J. T.; Nahm, N. J.; Guillemette, J. G.; Salerno, J. C.; Ghosh, D. K. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 5621-5629.
- (82) Ost, T. W. B.; Daff, S. *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 965-973.
- (83) Park, C. S.; Pardhasaradhi, K.; Gianotti, C.; Villegas, E.; Krishna, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1994**, 205, 85-91.
- (84) Morrissey, J. J.; McCracken, R.; Kaneto, H.; Vehaskari, M.; Montani, D.; Klahr, S. *Kidney International* **1994**, 45, 998-1005.
- (85) McNaughton, L.; Puttagunta, L.; Martinez-Cuesta, M. A.; Kneteman, N.; Mayers, I.; Moqbel, R.; Hamid, Q.; Radomski, M. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99, 17161-17166.
- (86) Asano, K.; Chee, C. B.; Gaston, B.; Lilly, C. M.; Gerard, C.; Drazen, J. M.; Stamler, J. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, 10089-10093.
- (87) Roberts, P. J.; Riley, G. P.; Morgan, K.; Miller, R.; Hunter, J. O.; Middleton, S. J. *Journal of Clinical Pathology* **2001**, 54, 293-297.
- (88) Shimizu, Y.; Sakai, M.; Umemura, Y.; Ueda, H. *The Journal of Dermatology* **1997**, 24, 80-87.
- (89) Laughlin, M. H.; Pollock, J. S.; Amann, J. F.; Hollis, M. L.; Woodman, C. R.; Price, E. M. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* **2001**, 90, 501-510.
- (90) Chambliss, K. L.; Shaul, P. W. *Endocrine Reviews* **2002**, 23, 665-686.
- (91) Harris, M. B.; Blackstone, M. A.; Ju, H.; Venema, V. J.; Venema, R. C. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **2003**, 285, H333-340.
- (92) Moncada, S. *Journal of the Royal Society of Medicine* **1999**, 92, 164-169.
- (93) Petros, A.; Lamb, G.; Leone, A.; Moncada, S.; Bennett, D.; Vallance, P. *Cardiovascular Research* **1994**, 28, 34-39.
- (94) Lopez, A.; Lorente, J. A.; Steingrub, J.; Bakker, J.; McLuckie, A.; Willatts, S.; Brockway, M.; Anzueto, A.; Holzapfel, L.; Breen, D.; Silverman, M. S.; Takala, J.; Donaldson, J.; Arneson, C.; Grove, G.; Grossman, S.; Grover, R. *Critical Care Medicine* **2004**, 32, 21-30.
- (95) Bove, P. F.; van der Vliet, A. *Free Radical Biology & Medicine* **2006**, 41, 515-527.
- (96) Ricciardolo, F. L. M.; Sterk, P. J.; Gaston, B.; Folkerts, G. *Physiological Reviews* **2004**, 84, 731-765.
- (97) Shaw, D. E.; Berry, M. A.; Thomas, M.; Green, R. H.; Brightling, C. E.; Wardlaw, A. J.; Pavord, I. D. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2007**, 176, 231-237.
- (98) Ayuse, T.; Brienza, N.; Revelly, J. P.; O'Donnell, C. P.; Boitnott, J. K.; Robotham, J. L. *The American Journal of Physiology* **1995**, 268, H1106-1114.
- (99) Fagan, K. A.; Tyler, R. C.; Sato, K.; Fouty, B. W.; Morris, K. G.; Huang, P. L.; McMurtry, I. F.; Rodman, D. M. *The American Journal of Physiology* **1999**, 277, L472-478.
- (100) Förstermann, U.; Dun, N. *Methods in Enzymology* **1996**, 268, 510-515.
- (101) Li, J.; Billiar, T. R. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **1999**, 276, G1069-G1073.
- (102) Vallance, P.; Moncada, S. *The Lancet* **1991**, 337, 776-778.
- (103) de Belder, A. J.; Radomski, M. W. *Journal of Hypertension* **1994**, 12, 617-624.

- (104) Silvagno, F.; Xia, H.; Bredt, D. S. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 11204-11208.
- (105) Tengan, C. I. H.; Kiyomoto, B. H.; Godinho, R. O.; Gamba, J.; Neves, A. C.; Schmidt, B.; Oliveira, A. S. B.; Gabbai, A. A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, *359*, 771-777.
- (106) Frandsen, U.; Lopez-Figueroa, M.; Hellsten, Y. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *227*, 88-93.
- (107) Ohkoshi, N.; Mizusawa, H.; Fujita, T.; Shoji, S. i. *Journal of the Neurological Sciences* **1997**, *149*, 151-156.
- (108) Stamler, J. S.; Meissner, G. *Physiological Reviews* **2001**, *81*, 209-237.
- (109) McConell, G. K.; Rattigan, S.; Lee-Young, R. S.; Wadley, G. D.; Merry, T. L. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *303*, E301-E307.
- (110) Eu, J. P.; Hare, J. M.; Hess, D. T.; Skaf, M.; Sun, J.; Cardenas-Navina, I.; Sun, Q.-A.; Dewhirst, M.; Meissner, G.; Stamler, J. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 15229-15234.
- (111) Palma, C. D.; Morisi, F.; Pambianco, S.; Assi, E.; Touvier, T.; Russo, S.; Perrotta, C.; Romanello, V.; Carnio, S.; Cappello, V.; Pellegrino, P.; Moscheni, C.; Bassi, M. T.; Sandri, M.; Cervia, D.; Clementi, E. *Skeletal Muscle*, *4*, 22.
- (112) Buono, R.; Vantaggiato, C.; Pisa, V.; Azzoni, E.; Bassi, M. T.; Brunelli, S.; Sciorati, C.; Clementi, E. *Stem Cells* **2012**, *30*, 197-209.
- (113) Cordani, N.; Pisa, V.; Pozzi, L.; Sciorati, C.; Clementi, E. *Stem Cells* **2014**, *32*, 874-885.
- (114) Chao, D. S.; Gorospe, J. R.; Brenman, J. E.; Rafael, J. A.; Peters, M. F.; Froehner, S. C.; Hoffman, E. P.; Chamberlain, J. S.; Bredt, D. S. *The Journal of Experimental Medicine* **1996**, *184*, 609-618.
- (115) Gücüyener, K.; Ergenekon, E.; Erbas, D.; Pinarli, G. A. I.; Serdaroğlu, A. *Brain and Development* **2000**, *22*, 181-183.
- (116) Kobayashi, Y. M.; Rader, E. P.; Crawford, R. W.; Iyengar, N. K.; Thedens, D. R.; Faulkner, J. A.; Parikh, S. V.; Weiss, R. M.; Chamberlain, J. S.; Moore, S. A.; Campbell, K. P. *Nature* **2008**, *456*, 511-515.
- (117) Dawson, T. M.; Snyder, S. H. *Journal of Neurosciences* **1994**, *14*, 5147-5159.
- (118) Guix, F. X.; Uribealago, I.; Coma, M.; Muñoz, F. J. *Progress in Neurobiology* **2005**, *76*, 126-152.
- (119) De Giorgio, R.; Parodi, J. E.; Brecha, N. C.; Brunnicardi, F. C.; Becker, J. M.; Go, V. L.; Sternini, C. *The Journal of Comparative Neurology* **1994**, *342*, 619-627.
- (120) Toda, N.; Ayajiki, K.; Okamura, T. *Pharmacology & Therapeutics* **2005**, *106*, 233-266.
- (121) Rivier, C. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2001**, *933*, 254-264.
- (122) McCann, S. M. *Experimental Gerontology* **1997**, *32*, 431-440.
- (123) Takahashi, T. *Journal of Gastroenterology* **2003**, *38*, 421-430.
- (124) Curro, D.; Preziosi, P. *General Pharmacology: The Vascular System* **1998**, *31*, 697-703.
- (125) Cooper, C. E.; Giulivi, C. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **2007**, *292*, C1993-2003.
- (126) Hecker, M.; Malsch, A.; Busse, R. *Journal of Neurochemistry* **1994**, *62*, 1524-1529.
- (127) Percival, J. M.; Anderson, K. N. E.; Huang, P.; Adams, M. E.; Froehner, S. C. *Journal of Clinical Investigation*, *120*, 816-826.
- (128) Michel, J. B.; Feron, O.; Sacks, D.; Michel, T. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 15583-15586.

- (129) Govers, R.; Sluijs, P. v. d.; Donselaar, E. v.; Slot, J.-W.; Rabelink, T. J. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2002**, *50*, 779-788.
- (130) Stolz, D. B.; Zamora, R.; Vodovotz, Y.; Loughran, P. A.; Billiar, T. R.; Kim, Y.-M.; Simmons, R. L.; Watkins, S. C. *Hepatology* **2002**, *36*, 81-93.
- (131) Collins, J. L.; Vodovotz, Y.; Hierholzer, C.; Villavicencio, R. T.; Liu, S.; Alber, S.; Gallo, D.; Stolz, D. B.; Watkins, S. C.; Godfrey, A.; Gooding, W.; Kelly, E.; Peitzman, A. B.; Billiar, T. R. *Shock (Augusta, Ga.)* **2003**, *19*, 117-122.
- (132) Loughran, P. A.; Stolz, D. B.; Vodovotz, Y.; Watkins, S. C.; Simmons, R. L.; Billiar, T. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 13837-13842.
- (133) Glynne, P. A.; Darling, K. E. A.; Picot, J.; Evans, T. J. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 33132-33138.
- (134) Kobzik, L.; Stringer, B.; Balligand, J. L.; Reid, M. B.; Stamler, J. S. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1995**, *211*, 375-381.
- (135) Bates, T. E.; Loesch, A.; Burnstock, G.; Clark, J. B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1995**, *213*, 896-900.
- (136) Bates, T. E.; Loesch, A.; Burnstock, G.; Clark, J. B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *218*, 40-44.
- (137) Gao, S.; Chen, J.; Brodsky, S. V.; Huang, H.; Adler, S.; Lee, J. H.; Dhadwal, N.; Cohen-Gould, L.; Gross, S. S.; Goligorsky, M. S. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 15968-15974.
- (138) Ghafourifar, P.; Richter, C. *FEBS Letters* **1997**, *418*, 291-296.
- (139) Ghafourifar, P.; Cadenas, E. *Trends in Pharmacological Sciences* **2005**, *26*, 190-195.
- (140) Tengan, C. H.; Rodrigues, G. S.; Godinho, R. O. *International Journal of Molecular Sciences* **2012**, *13*, 17160-17184.
- (141) Lowenstein, C. J.; Alley, E. W.; Raval, P.; Snowman, A. M.; Snyder, S. H.; Russell, S. W.; Murphy, W. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 9730-9734.
- (142) Balligand, J. L.; Feron, O.; Dessy, C. *Physiological Reviews* **2009**, *89*, 481-534.
- (143) Potente, M.; Urbich, C.; Sasaki, K.-i.; Hofmann, W. K.; Heeschen, C.; Aicher, A.; Kollipara, R.; DePinho, R. A.; Zeiher, A. M.; Dimmeler, S. *Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115*, 2382-2392.
- (144) Ravi, K.; Brennan, L. A.; Levic, S.; Ross, P. A.; Black, S. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 2619-2624.
- (145) Dimmeler, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Hermann, C.; Busse, R.; Zeiher, A. M. *Nature* **1999**, *399*, 601-605.
- (146) Fulton, D.; Gratton, J.-P.; McCabe, T. J.; Fontana, J.; Fujio, Y.; Walsh, K.; Franke, T. F.; Papapetropoulos, A.; Sessa, W. C. *Nature* **1999**, *399*, 597-601.
- (147) Bauer, P. M.; Fulton, D.; Boo, Y. C.; Sorescu, G. P.; Kemp, B. E.; Jo, H.; Sessa, W. C. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 14841-14849.
- (148) Matsubara, M.; Hayashi, N.; Jing, T.; Titani, K. *Journal of Biochemistry* **2003**, *133*, 773-781.
- (149) Nakane, M.; Mitchell, J.; FÄrstermann, U.; Murad, F. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *180*, 1396-1402.
- (150) Dreyer, J.; Hirlinger, D.; MÄller-Esterl, W.; Oess, S.; Kuner, R. *Neuroscience Letters* **2003**, *350*, 13-16.
- (151) Dedio, J.; KÄnig, P.; Wohlfart, P.; Schroeder, C.; Kummer, W.; MÄller-Esterl, W. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2001**, *15*, 79-89.

- (152) Werner, E. R.; Pitters, E.; Schmidt, K.; Wachter, H.; Werner-Felmayer, G.; Mayer, B. *Biochemical Journal* **1996**, 320, 193-196.
- (153) Bömmel, H. M.; Reif, A.; Fröhlich, L. G.; Frey, A.; Hofmann, H.; Marecak, D. M.; Groehn, V.; Kotsonis, P.; La, M.; Köster, S.; Meinecke, M.; Bernhardt, M.; Weeger, M.; Ghisla, S.; Prestwich, G. D.; Pfeleiderer, W.; Schmidt, H. H. H. W. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273, 33142-33149.
- (154) Levine, R. A.; Miller, L. P.; Lovenberg, W. *Science (New York, N.Y.)* **1981**, 214, 919-921.
- (155) Kapatos, G.; Hirayama, K.; Hasegawa, H. *Journal of Neurochemistry* **1992**, 59, 2048-2055.
- (156) Vítěček, J.; Lojek, A.; Valacchi, G.; Kubala, L. *Mediators of Inflammation* **2012**.
- (157) Chatterjee, P. K.; Patel, N. S.; Sivarajah, A.; Kvale, E. O.; Dugo, L.; Cuzzocrea, S.; Brown, P. A.; Stewart, K. N.; Mota-Filipe, H.; Britti, D.; Yaqoob, M.; Thiemermann, C. *Kidney International* **2003**, 63.
- (158) Vallance, P.; Leone, A.; Calver, A.; Collier, J.; Moncada, S. *Lancet (London, England)* **1992**, 339, 572-575.
- (159) MacAllister, R. J.; Whitley, G. S.; Vallance, P. *Kidney International* **1994**, 45, 737-742.
- (160) Wolff, D. J.; Datto, G. A.; Samatovicz, R. A.; Tempick, R. A. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, 9425-9429.
- (161) Stuehr, D. J.; Fasehun, O. A.; Kwon, N. S.; Gross, S. S.; Gonzalez, J. A.; Levi, R.; Nathan, C. F. *The FASEB Journal* **1991**, 5, 98-103.
- (162) Li, Y.; Wang, H.; Tarus, B.; Perez, M. R.; Morellato, L.; Henry, E.; Berka, V.; Tsai, A.-L.; Ramassamy, B.; Dhimane, H.; Dessy, C.; Tauc, P.; Boucher, J.-L.; Deprez, E.; Slama-Schwok, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, 109, 12526-12531.
- (163) Rouaud, F.; Romero-Perez, M.; Wang, H.; Lobysheva, I.; Ramassamy, B.; Henry, E.; Tauc, P.; Giaccherio, D.; Boucher, J.-L.; Deprez, E.; Rocchi, S. p.; Slama-Schwok, A. *Oncotarget* **2014**, 5, 10650-10664.
- (164) Robin, A.-C.; Gmouh, S.; Mongin, O.; Jouikov, V.; Werts, M. H. V.; Gautier, C. m.; Slama-Schwok, A.; Blanchard-Desce, M. *Chemical Communications (Cambridge, England)* **2007**, 1334-1336.
- (165) Beaumont, E.; Lambry, J.-C.; Gautier, C. m.; Robin, A.-C.; Gmouh, S.; Berka, V.; Tsai, A.-L.; Blanchard-Desce, M.; Slama-Schwok, A. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129, 2178-2186.
- (166) Beaumont, E.; Lambry, J.-C.; Blanchard-Desce, M.; Martasek, P.; Panda, S. P.; van Faassen, E. E. H.; Brochon, J.-C.; Deprez, E.; Slama-Schwok, A. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* **2009**, 10, 690-701.
- (167) Rogers, J. E.; Slagle, J. E.; McLean, D. G.; Sutherland, R. L.; Brant, M. C.; Heinrichs, J.; Jakubiak, R.; Kannan, R.; Tan, L.-S.; Fleitz, P. A. *The Journal of Physical Chemistry. A* **2007**, 111, 1899-1906.
- (168) Lambry, J.-C.; Beaumont, E.; Tarus, B.; Blanchard-Desce, M.; Slama-Schwok, A. *Journal of molecular recognition: JMR* **2010**, 23, 379-388.
- (169) Beaumont, E.; Lambry, J.-C.; Robin, A.-C.; Martasek, P.; Blanchard-Desce, M.; Slama-Schwok, A. *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* **2008**, 9, 2325-2331.
- (170) Dumat, B.; Bordeau, G.; Aranda, A. I.; Mahuteau-Betzer, F.; Harfouch, Y. E.; Metgé, G.; Charra, F.; Fiorini-Debuisschert, C.; Teulade-Fichou, M.-P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, 10, 6054-6061.

- (171) Dumat, B.; Bordeau, G.; Faurel-Paul, E.; Mahuteau-Betzer, F.; Saettel, N.; Metge, G.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Teulade-Fichou, M.-P. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 12697-12706.
- (172) Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*, 1249-1262.
- (173) Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chemical Reviews* **2013**, *113*, 4905-4979.
- (174) Agalave, S. G.; Maujan, S. R.; Pore, V. S. *Chemistry - An Asian Journal* **2011**, *6*, 2696-2718.
- (175) Nguyen, N. H. *Thèse de doctorat de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan* **2015**.
- (176) Valverde, I. E.; Bauman, A.; Kluba, C. A.; Vomstein, S.; Walter, M. A.; Mindt, T. L. *Angewandte Chemistry International Edition* **2013**, *52*, 8957-8960.
- (177) Baggailey, E.; Gill, M. R.; Green, N. H.; Turton, D.; Sazanovich, I. V.; Botchway, S. W.; Smythe, C.; Haycock, J. W.; Weinstein, J. A.; Thomas, J. A. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 3367-3371.
- (178) Yuan, L.; Wang, L.; Agrawalla, B. K.; Park, S.-J.; Zhu, H.; Sivaraman, B.; Peng, J.; Xu, Q.-H.; Chang, Y.-T. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 5930-5938.
- (179) Packer, A. M.; Peterka, D. S.; Hirtz, J. J.; Prakash, R.; Deisseroth, K.; Yuste, R. *Nature Methods* **2012**, *9*, 1202-1205.
- (180) Prakash, R.; Yizhar, O.; Grewe, B.; Ramakrishnan, C.; Wang, N.; Goshen, I.; Packer, A. M.; Peterka, D. S.; Yuste, R.; Schnitzer, M. J.; Deisseroth, K. *Nature Methods* **2012**, *9*, 1171-1179.
- (181) Chennoufi, R.; Bougherara, H.; Gagey-Eilstein, N.; Dumat, B.; Henry, E.; Subra, F.; Mahuteau-Bretzer, F.; Tauc, P.; Teulade-Fichou, M.-P.; Deprez, E. *Chemical Communications* **2015**.
- (182) Wickman, G. R.; Julian, L.; Mardilovich, K.; Schumacher, S.; Munro, J.; Rath, N.; Zander, S. A.; Mleczak, A.; Sumpton, D.; Morrice, N.; Bienvenut, W. V.; Olson, M. F. *Cell Death & Differentiation* **2013**, *20*, 1293-1305.
- (183) Chennoufi, R.; Bougherara, H.; Gagey-Eilstein, N.; Dumat, B.; Henry, E.; Subra, F.; Bury-Moné, S.; Mahuteau-Bretzer, F.; Tauc, P.; Teulade-Fichou, M.-P.; Deprez, E.
- (184) Koopman, G.; Reutelingsperger, C. P.; Kuijten, G. A.; Keehnen, R. M.; Pals, S. T.; Oers, M. H. v. *Blood* **1994**, *84*, 1415-1420.
- (185) Jáchymová, M.; Martíásek, P.; Panda, S.; Roman, L. J.; Panda, M.; Shea, T. M.; Ishimura, Y.; Kim, J.-J. P.; Masters, B. S. S. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 15833-15838.
- (186) Raman, C. S.; Li, H.; Martíásek, P.; Král, V.; Masters, B. S. S.; Poulos, T. L. *Cell* **1998**, *95*, 939-950.
- (187) Velazquez, C.; Praveen Rao, P. N.; Knaus, E. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 4061-4067.
- (188) Kim, J.; Saravanakumar, G.; Choi, H. W.; Park, D.; Kim, W. J. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 341-356.
- (189) Ford, P. C. *Nitric Oxide* **2013**, *34*, 56-64.
- (190) Storm, W. L.; Schoenfish, M. H. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 4904-4912.
- (191) Sortino, S. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *22*, 301-318.
- (192) Pieper, A. A.; Verma, A.; Zhang, J.; Snyder, S. H. *Trends in Pharmacological Sciences* **1999**, *20*.

- (193) Xia, Y.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; Snyder, S. H.; Zweier, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, 93.
- (194) Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. *Apoptosis* **2007**, 12.
- (195) Kumar, N.; Bhalla, V.; Kumar, M. *Coordination Chemistry Reviews* **2013**, 257, 2335-2347.
- (196) Yu, H.; Zhang, X.; Xiao, Y.; Zou, W.; Jin, L. *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 7076-7084.
- (197) Pepke-Zaba, J.; Higenbottam, T. W.; Dinh-Xuan, A. T.; Stone, D.; Wallwork, J. *The Lancet* **1991**, 338, 1173-1174.
- (198) Palmer, R. M. J.; Ferrige, A. G.; Moncada, S. *Nature* **1987**, 327, 524-526.
- (199) Brüne, B.; von Knethen, A.; Sandau, K. B. *Cell Death and Differentiation* **1999**, 6, 969-975.
- (200) Chung, H.; Pae, H.; Choi, B.; Billiar, T. R.; Kim, Y. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, 282, 1075-1079.
- (201) Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemin, F.; Müller, J.-F.; Barberi-Heyob, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13, 2799-2808.
- (202) Ronson, R. S.; Nakamura, M.; Vinten-Johansen, J. *Cardiovascular Research* **1999**, 44, 47-59.
- (203) Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R. *Nature Reviews Cancer* **2006**, 6, 535-545.
- (204) Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L.; Henson, P. M. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **1992**, 148, 2207-2216.
- (205) Gollnick, S. O.; Evans, S. S.; Baumann, H.; Owczarczak, B.; Maier, P.; Vaughan, L.; Wang, W. C.; Unger, E.; Henderson, B. W. *British Journal of Cancer* **2003**, 88, 1772-1779.
- (206) Korbelik, M.; Sun, J.; Cecic, I. *Cancer Research* **2005**, 65, 1018-1026.
- (207) Todryk, S.; Melcher, A. A.; Hardwick, N.; Linardakis, E.; Bateman, A.; Colombo, M. P.; Stoppacciaro, A.; Vile, R. G. *The Journal of Immunology* **1999**, 163, 1398-1408.
- (208) Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Konowal, A.; Freed, P. W.; Westcott, J. Y.; Henson, P. M. *Journal of Clinical Investigation* **1998**, 101, 890-898.
- (209) Cvetanovic, M.; Ucker, D. S. *The Journal of Immunology* **2004**, 172, 880-889.
- (210) Xu, W.; Roos, A.; Schlagwein, N.; Woltman, A. M.; Daha, M. R.; van Kooten, C. *Blood* **2006**, 107, 4930-4937.
- (211) Melcher, A.; Gough, M.; Todryk, S.; Vile, R. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* **1999**, 77, 824-833.
- (212) Zitvogel, L.; Casares, N.; Péquignot, M. O.; Chaput, N.; Albert, M. L.; Kroemer, G.; Immunology, B. T. A. i.; Academic Press: 2004; Vol. 84, p 131-179.
- (213) Asconapé, J. J. *Handbook of Clinical Neurology* **2014**, 119, 417-432.
- (214) Dreisbach, A. W.; Lertora, J. J. L. *Seminars in Dialysis* **2003**, 16, 45-50.
- (215) Lalande, L.; Charpiat, B.; Leboucher, G.; Tod, M. *Clinical Pharmacokinetics* **2014**, 53, 521-532.
- (216) Calzavara-Pinton, P.; Venturini, M.; Sala, R. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2007**, 21, 293-302.
- (217) Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I. *The Lancet Oncology* **2004**, 5, 497-508.
- (218) Moore, C. M.; Pendse, D.; Emberton, M. *Nature Reviews Urology* **2009**, 6, 18-30.
- (219) Sacconi, L.; Dombeck, D. A.; Webb, W. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, 103, 3124-3129.

- (220) Kim, P.; Puoris'haag, M.; Côté, D.; Lin, C. P.; Yun, S. H. *Journal of biomedical optics* **2008**, *13*, 010501.
- (221) Peyrot, D. A.; Lefort, C.; Steffenhagen, M.; Mansuryan, T.; Ducourthial, G.; Abi-Haidar, D.; Sandeau, N.; Vever-Bizet, C.; Kruglik, S. G.; Thiberville, L.; Louradour, F.; Bourg-Heckly, G. *Biomedical Optics Express* **2012**, *3*, 840-853.
- (222) Dhakal, K. R.; Gu, L.; Shivalingaiah, S.; Dennis, T. S.; Morris-Bobzean, S. A.; Li, T.; Perrotti, L. I.; Mohanty, S. K. *PLoS ONE* **2014**, *9*.
- (223) Abels, C. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2004**, *3*, 765-771.
- (224) Gilissen, M. J.; Wit, L. E. A. v. d. M.-d.; Star, W. M.; Koster, J. F.; Sluiter, W. *Cancer Research* **1993**, *53*, 2548-2552.
- (225) Fingar, V. H.; Wieman, T. J.; Doak, K. W. *Cancer Research* **1990**, *50*, 2599-2603.
- (226) Fingar, V. H. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery* **1996**, *14*, 323-328.

Titre : Etudes des relations structure-activités de molécules photoactivables pour imager et déclencher des processus biologiques sous excitation 2-photon

Mots clés : thérapie photodynamique, oxyde nitrique, photo-activation, excitation 2-photon

Résumé : Les travaux présentés dans ce manuscrit abordent l'étude de deux familles distinctes de molécules photoactivables induisant des processus biologiques différents sous excitation 2-photon : les triphénylaminés (TPAs) et les Nanotriggers de deuxième génération (NTs). Les TPAs présentent un grand intérêt pour la thérapie photodynamique (PDT) 2-photon, grâce à leur section efficace d'absorption 2-photon élevées (325-764 GM) et leur capacité à induire la mort cellulaire, médiée par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sous excitation 1- ou 2-photon. De plus, leur forte fluorescence permet d'imager la mort cellulaire grâce à un comportement singulier dans les cellules : les TPAs sont initialement localisés dans le cytoplasme des cellules vivantes, principalement au niveau mitochondrial, mais se re-localisent dans le noyau des cellules en apoptose. Les NTs de deuxième génération ont été conçus suivant le modèle de NT1, le premier Nanotrigger synthétisé. Leur structure générale a été conceptualisée pour se fixer à la protéine NO synthase (NOS) et générer un potentiel redox élevé uniquement sous excitation lumineuse, initiant ainsi un transfert d'électron à travers la NOS aboutissant à une production de NO. Les structures chimiques des sept molécules nouvellement synthétisées diffèrent à plusieurs niveaux. Cette étude a permis d'identifier, parmi les sept NT de deuxième génération, deux molécules ayant la capacité de pénétrer dans les cellules endothéliales, de cibler la eNOS et d'initier le transfert d'électron à travers la eNOS sous excitation 1- ou 2-photon. Les expériences réalisées au cours de cette thèse sur les deux familles de composés, ont également permis de mettre en évidence les relations entre la structure des molécules et les différents mécanismes induits par leur photo-activation.

Title : Structure-activity relationship studies of photoactivatable molecules upon two-photon excitation for imaging and triggering biological processes

Keywords : photodynamic therapy, nitric oxide, photo-activation, two-photon excitation

Abstract : The presented works in this manuscript approach the study of two distinct families of photoactivatable molecules that induce different biological processes under 2-photon excitation : triphenylamines (TPAs) and second generation Nanotriggers (NTs). TPAs present a great interest for 2-photon photodynamic therapy (PDT), thanks to their high 2-photon absorption cross-sections (325-764 GM) and their ability to induce cell death mediated by reactive oxygen species (ROS) production under 1- or 2-photon excitation. Moreover, their high fluorescence allows the imaging of cell death due to their particular behaviour in cells: TPAs initially localize in the cytoplasm of living cells, but translocate to the nucleus of apoptotic cells. Second generation NTs were designed based on the model of NT1, the first synthesized Nanotrigger. Their general structure has been designed to bind to the NO Synthase protein (NOS) and generate a high redox potential under excitation only, leading to the initiation of the electron flow through the protein and resulting in NO production. The chemical structures of the seven newly synthesized molecules differ on many levels. This study has identified, among the seven second generation NTs, two molecules which are able to penetrate in endothelial cells, target eNOS and initiate the electron transfer at the eNOS level under 1- or 2-photon excitation. The experiments presented in this thesis allowed to establish structure-activity relationships for each compound family regarding the different mechanisms induced by their photoactivation.